

Beeinflussung der Adhärenz und der Internalisierung von Porphyromonas gingivalis durch Proteinaseinhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von:

Christin Mihm
geboren am: 14.7.1974
in Erfurt

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena**
- 2. Prof. Dr. Eike Glockmann, Jena**
- 3. PD Dr. Sigrun Eick, Bern (Schweiz)**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.11.2010

Gewidmet meinen Eltern.

Inhalt	Seite
1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	7
2.1. Biologische Funktion von Proteasen und Proteaseinhibitoren	8
2.2. Porphyromonas gingivalis: Biologie und klinische Bedeutung	10
2.3. Beschreibung ausgewählter Proteinaseinhibitoren	24
3. Ziele der Arbeit	26
4. Materialien	27
4.1. Testkeime	27
4.2. KB- Zellen	27
4.3. Proteinaseinhibitoren	27
4.4. Nährmedien	28
4.5. Lösungsmittel und Zusätze	28
4.6. Geräte, Apparaturen, Hilfsmittel	29
5. Methoden	31
5.1. Durchführung der Untersuchung zur Wirkung der Proteinaseinhibitoren auf Adhärenz und Internalisierung	31
5.2. Durchführung der Untersuchung zur Wirkung der Proteinaseinhibitoren auf die Hämagglutination	32
5.3. Statistik	32
6. Ergebnisse	33
6.1. Untersuchung zur Wirkung von Proteinaseinhibitoren auf die Adhärenz von Porphyromonas gingivalis	33
6.2. Untersuchung zur Wirkung von Proteinaseinhibitoren auf die Internalisierung von Porphyromonas gingivalis	39
6.3. Untersuchung zur Wirkung von Proteinaseinhibitoren auf die Hämagglutination	44
7. Diskussion	46
8. Schlussfolgerungen	53
9. Literaturverzeichnis	54
Anhang	66
Danksagung	77
Lebenslauf	78
Ehrenwörtliche Erklärung	79

1. Zusammenfassung

Die steigende Zahl an Parodontalerkrankungen und die damit verbundene Komorbidität führt weltweit zu einem zunehmenden Interesse an der Ursachenforschung und der Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen. Dabei steht die Parodontitis als häufigste Ursache für Zahnextraktionen deutlich vor der Karies.

Bei der Parodontitis handelt es sich primär um eine bakteriell induzierte entzündliche Infektionskrankheit des Parodontiums. Von den über 500 subgingival nachgewiesenen Mikroorganismen stehen nur wenige eng mit dieser Erkrankung in Verbindung. Zu diesen wird *Porphyromonas gingivalis* gezählt, welcher darüber hinaus durch den Einsatz einer Reihe von Virulenzfaktoren, eine Schlüsselfunktion bei der Parodontitis einnimmt. Eine bedeutende Rolle nehmen hierbei die Cysteinproteinasen, Gingipaine, ein. Die für diese extrazellulären Produkte kodierenden Gene sind *rgpA*, *rgpB* und *kgp*. Die Wirkung hat unter anderem eine Steigerung der Gefäßpermeabilität und eine Aktivierung der Blutgerinnung zur Folge. Außerdem kann man die Beeinflussung des Komplementsystems und eine Manipulation des Zytokinhaushaltes der Entzündungskaskaden beobachten. Gingipaine unterstützen die Kolonisierung von *Porphyromonas gingivalis* durch Bindung zu anderen Bakterien und epithelialen Zellen. Sie vermögen an Laminin, Fibrinogen, Hämoglobin und an Kollagen zu binden. Sie regulieren die Infektionsintensität, den Bakterienhaushalt und die Fimbrienreifung. Die vorliegenden Daten zeigen, dass diese Enzyme potente Virulenzfaktoren darstellen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Blockierung der Gingipaine durch Einsatz synthetischer Proteinaseinhibitoren und die damit verbundene Reduktion der Virulenz von *Porphyromonas gingivalis*. Dabei sollte vor allem die Fähigkeit der Adhärenz und Internalisierung in Parodontalzellen im Vordergrund stehen. Die Versuche wurden mit dem Referenzstamm *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 durchgeführt. Die verwendeten Proteinaseinhibitoren waren synthetische Inhibitoren vom Benzamidintyp.

Hierfür wurden epitheliale KB-Zellen mit der Bakteriensuspension und zwei verschiedenen Konzentrationen der Inhibitorlösungen sowie einer Kontrolle für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Kolonienzahl bestimmt. Eine signifikante Hemmung der Adhärenz konnte in beiden Konzentrationen nur bei Inhibitor 9, dem Pentamidin, nachgewiesen werden. Der Inhibitor 7, ein einfaches Benzamidinderivat, zeigte nur in der höheren Konzentration

eine signifikante Hemmung der Adhärenz. Die Internalisierung blieb in beiden Konzentrationen bei allen getesteten Inhibitoren ohne signifikante Veränderung.

Die sogenannte Hämagglutinin/Adhäsions-Domäne des Bakteriums ist an der Hämoglobinbindung beteiligt und daraus resultierend bei der Hämakquisition aus Erythrozyten involviert. Die Konsequenz daraus ist eine durch Gingipaine vermittelte Erythrozytenagglutination. Da auch die Hämagglutinationsfähigkeit, eine grundlegende Voraussetzung für die Adhärenz an Wirtszellen darstellt, sollte auch hierfür der Einfluss der Proteinaseinhibitoren getestet werden. Diese Versuche wurden mit dem Referenzstamm *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 und dem klinischen Isolat JH16-1 durchgeführt. Eine Hemmung der Hämagglutination des ATCC-Stammes wurde nach Zugabe der Bisbenzamidinderivate mit Pentamin-ähnlicher Struktur (Inhibitoren 1, 4 und 6) und dem Pentamin (Inhibitor 9) in beiden Konzentrationen beobachtet. Die Substanz 2, das Bisbenzamidin, hatte Effekt nur in der höheren Konzentration. Die Hämagglutination des Stammes JH16-1 wurde durch den Inhibitor 1 in beiden Konzentrationen, durch den Inhibitor 4 in niedriger Konzentration und durch die Substanzen 6 und 9 nur in der höheren Konzentration vermindert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass synthetische Proteinaseinhibitoren vom Benzamidintyp möglicherweise einen hohen Stellenwert in der Beeinflussung der Pathogenität von *Porphyromonas gingivalis* besitzen könnten. Aus diesem Grund sollten sie und Derivate in weiteren In vitro- Untersuchungen mit einbezogen werden.

2. Einleitung

Bakterielle Adhärenz an und nachfolgende Internalisierung in Epithelzellen sind für eine Reihe von bakteriellen Infektionen des Menschen entscheidende pathogenetische Vorgänge (Straube et al. 1992, 1993). Zum einen nutzen die Mikroorganismen die häufig bestehende eingeschränkte Immunreaktion des kranken Menschen und zum anderen bedienen sie sich einer Vielzahl von Virulenzfaktoren.

So kann man auch in der Mundhöhle neben einer residenten Flora, bestehend aus grampositiven und gramnegativen Keimen, einen parodontopathogenen Keim nachweisen, welcher sich einer Reihe von Virulenzfaktoren bedient. In der subgingivalen Plaque wird häufig *Porphyromonas gingivalis* gefunden. Es handelt sich um ein gramnegatives, kurzes unbewegliches, strikt anaerobes Stäbchen, welches ein schwarzbraunes Pigment produziert. Die Arbeitsgruppe um Potempa und Travis konnte zeigen, daß *Porphyromonas gingivalis* zahlreiche Cystein-Proteinasen mit Trypsin-ähnlicher Aktivität besitzt, die als Gingipaine bezeichnet werden (Potempa et al. 1995, 1997; Travis et al. 1997).

An einer Entzündung des Parodonts leiden 85% der in Deutschland lebenden Bevölkerung (Merte 1992). Interessantes erbrachte die jüngste Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Bei den 35-44-Jährigen deutschen Erwachsenen entwickelten sich die Parodontalerkrankungen im untersuchten Zeitraum von 1997 bis 2005 wie folgt: Mittelschwere Parodontitiden nahmen von 32,2% auf 52,7% zu. Schwere Parodontitiden nahmen von 14,1% auf 20,5% zu. Bei den Senioren (65-74 Jahre) sind inzwischen 48% von einer mittelschweren und 39,8% von einer schweren Parodontitis betroffen. In dieser Altersgruppe entwickelte sich folglich eine famose 23,7%ige Zunahme der Prävalenz innerhalb von nur 9 Jahren (Micheelis und Schiffner 2006). Früh beginnende und rasch fortschreitende Parodontitiden führen durch Zerstörung des Zahnhalteapparates häufig zum Zahnverlust. Nachfolgende prothetische Maßnahmen und prophylaktisch längerfristige systemische bzw. lokale Applikation von antimikrobiell wirkenden Substanzen erfordern einen hohen therapeutischen und finanziellen Aufwand. Therapeutische Möglichkeiten bestehen bei schwerer Parodontitis marginalis aus einer adjuvanten systemischen bzw. lokalen Applikation von antimikrobiell wirkenden Substanzen. Als Antibiotika werden vorwiegend Tetrazykline, Metronidazol und Clindamycin eingesetzt (Jeffcoat et al. 1997).

Die chirurgische Therapie beruht zum einen auf der Entfernung von subgingivalen Konkrementen, das „Deep scaling“ und zum anderen auf eine Glättung der Wurzeloberfläche, dem „Root planing“.

Notwendige prothetische Maßnahmen und prophylaktisch längerfristige systemische bzw. lokale Applikation von antimikrobiell wirkenden Substanzen erfordern einen hohen therapeutischen und finanziellen Aufwand.

Als ein neuer therapeutischer Ansatz ist die Beeinflussung bzw. Reduktion der Virulenz von *Porphyromonas gingivalis* durch spezifische Inhibitoren der bakteriellen Proteasen zu sehen. Gegenstand vorliegender Arbeit ist die In-vitro Untersuchung zur Beeinflussung von Virulenzfaktoren durch Proteinaseinhibitoren von Benzamidin-Typ.

2.1. Biologische Funktion von Proteasen und Proteaseinhibitoren

Proteasen (synonym: Peptidhydrolasen, Peptidasen, Proteinasen) werden definiert als Enzyme, welche die hydrolytische Spaltung von Peptidverbindungen katalysieren. Je nach Lage der hydrolysierten Polypeptidbindungen in der Polypeptidkette unterscheidet man Endo- und Exopeptidasen. Endopeptidasen spalten innerhalb der Kette liegende Peptidbindungen, die Exopeptidasen spalten Aminosäuren von den Peptidenden.

Nach ihrem Wirkungsort trennt man saure, alkalische und neutrale Proteinase. Aufgrund ihrer katalytischen Mechanismen sind sie in 4 Gruppen klassifiziert (Enzyme Nomenclature, 1978): Serin-, Cystein-, Asparagin- und Metalloproteasen. Diese Einteilung wurde indirekt durch die Reaktion des Inhibitors an den Resten der aktiven Region bestimmt.

Proteinase treten intra- und extrazellulär auf, wobei intrazelluläre Proteinase eine Schlüsselrolle in der Regulation von metabolischen Prozessen innehaben (Goldberg und St. John 1976; Wolf 1980). Für Proteinsynthese-, umsatz- und aktivität spielen sie eine wichtige Rolle (Segal und Doyle 1978). Sie sind an vielen physiologischen Funktionen des menschlichen Körpers beteiligt. Vor allem an der Verdauung (Pepsin, Pankreozymin, Trypsin, Chemotrypsin und Elastase), der Immunabwehr (Komplementfaktoren) und der Bildung und Aktivierung von Hormonen (Stroud et al. 1975; Reid und Porter 1981; Docherty

und Steiner 1982; Hirsch 1982; North 1982; Taylor 1983; Mizuno und Matsuo 1984). Zu den wichtigen Funktionen gehören auch die Entzündungsprozesse, die Blutgerinnung (Prothrombin, Plasmin, Kallekrein) und die Fibrinolyse (Holzer und Tschesche 1979; Jackson und Nemerson 1980; Bach 1982; Doolittle 1984; Gordon und Koj 1985). Dabei werden zum Beispiel inaktive Vorstufen (Zymogene) in aktive Formen umgewandelt.

Weitere Aufgaben sind Befruchtung und Zellteilung, die Regulation der Genexpression, die DNA-Synthese und Reparatur, die Adaptation der Zellen an neue Umweltbedingungen oder der Degradation von abnormen Proteinen (Potemsky et al. 1978; Roberts et al. 1978; Voellmy et al. 1979; Maurizi und Switzer 1980; Wolf 1980, 1986; Gottesman 1981; Herskho und Ciechanover 1982; North 1982; Walker 1985; Wong et al. 1987).

Extrazelluläre Proteasen sind hauptsächlich an der Hydrolyse der langen Polypeptidketten in kleinere molekulare Einheiten beteiligt, die später von verschiedenen Zellen aufgenommen werden. Sie besitzen meist eine sehr breite Substratspezifität (Law 1980).

Eine große Anzahl an Kontrollmechanismen der Proteolyse sind bekannt. Diese beinhalten Modulationen von Substratproteinen durch Strukturveränderungen, Veränderungen in der Wasserlöslichkeit oder der Empfänglichkeit für eine Proteolyse (Holzer und Heinrich 1980; Herskho und Ciechanover 1982). Proteaseaktivität wird auch durch Nährstoffbedingungen und Hemmung des Katabolismus kontrolliert (Goldberg und St. John 1976).

Ein weiterer Mechanismus ist der Einsatz von Inhibitoren. Darunter versteht man Hemmstoffe (Peptid- und Proteinverbindungen) von proteolytischen Enzymen mit spezifischen und auch unspezifischen Wirkungen (Katunuma et al. 1983). Durch Bindung an das jeweilige Enzym wird eine Inaktivierung ausgelöst. Beispielsweise α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin im Blutplasma. Vertreter von Inhibitoren aus Mikroorganismen sind Leupeptin (Streptomyces-Arten), Antipain und Hirudin, welche die Blutgerinnung und vaskuläre Permeabilität beeinflussen.

Die eigentliche Aufgabe der Inhibitoren ist der Schutz der Zelle vor proteolytischer Zerstörung durch Kontrolle des Umsatzes und der Aktivität (Cohen und Holzer 1979).

Eine Reihe von Mikroorganismen, vor allem die in Infektionsprozessen involviert sind, sezernieren Proteinasen (North 1982; Zlotnik et al. 1984; Sheperd et al. 1985).

Die Virulenz der Organismen korreliert mit der Aktivität der extrazellulären Proteinasen. Proteinaseinhibitoren könnten allgemein als eine neue Klasse antimikrobieller Substanzen auch in der Bekämpfung anderer Erreger mit Proteasen Bedeutung besitzen (Curtis et al. 2001).

2.2. Porphyromonas gingivalis: Biologie und klinische Bedeutung

Biologie

Ein typischer Vertreter der Mikroorganismen, welche sich Proteinase zunutze machen, ist das Bakterium *Porphyromonas gingivalis*. Es handelt sich bei diesem Erreger um einen physiologischen Schleimhautbewohner, der als fakultativ pathogener, sogenannter opportunistischer Erreger, endogene Infektionen hervorrufen kann.

Porphyromonas gingivalis ist ein schwarz pigmentiertes, gramnegatives, unbewegliches kurzes Stäbchen mit Kapsel und Fimbrien. Das Pigment entspricht einem Hämatinabkömmling (Lamont und Jenkinson 1998). Es stellt eventuell einen Abwehrmechanismus gegen toxisch-oxidative Sauerstoffmetabolite dar, da das eisenporphyrinhaltige, schwarze Pigment Hämatin nicht nur Sauerstoff, sondern auch reaktive Oxidationsmittel von polymorphkernigen Granulozyten (PMN) binden und diesen „oxidativen Stress“ neutralisieren kann (Baehni et al. 1979). *Porphyromonas gingivalis* ist ein obligat anaerobes sporenloses Stäbchen, dessen Wachstumsoptimum bei 37° C und einer Atmosphäre von 80-85% Stickstoff, 10% Wasserstoff und 5-10% Kohlendioxid liegt. Unter guten Kulturbedingungen besitzt *Porphyromonas gingivalis* eine Generationszeit von 60 Minuten, andernfalls 2-8 Stunden. Schon nach zweitägiger Kulturzeit kann man runde punktförmig erhabene, schwarz-grüne Kolonien erkennen (Kornman 1988).

Die Bakterienspezies kann vor allem aus dem Zahnfleischsulkus, von der Zunge, der bukkalen Mukosa, von der Zahnhartsubstanz und peritonsillär von erkrankten als auch von gesunden Personen angezüchtet werden (Cutler et al. 1995; Marsh und Martin 2003).

Der Zahnfleischsulkus ist ein ca. 0,5- 3,5mm tiefer Spalt zwischen Zahn und Zahnfleisch und ist der Eingang sowie eine hervorragende Nische für ein einzigartiges Ökosystem (Cutler et al. 1995). *Porphyromonas gingivalis* gehört zu den Keimen, die sich spät bzw. sekundär in die Plaque ansiedeln.

Dazu schaffen vorangehende Keime, wie *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Veillonella* spp. und *Capnocytophaga* spp. folgende optimale Voraussetzungen (Weinberg und Belton 1997). Sie unterstützen die Kolonisation von *Porphyromonas gingivalis*, indem sie die Adhärenz des Keimes ermöglichen. Außerdem stellen sie dem Keim Wachstumssubstanzen zur Verfügung und reduzieren die Sauerstoffdichte.

Der Mechanismus, mit dem der Keim in das Gewebe eindringt und sich niederlässt, ist noch nicht genau definiert. Die transienten lokalen und systemischen Veränderungen in der Immunabwehr des Wirtes, die heimische Mikroflora, als auch die Verfügbarkeit an essentiellen Nährstoffen in der Zahnfleischtasche, sind mögliche wichtige Indikatoren für *Porphyromonas gingivalis* (Cutler et al. 1995).

Die Möglichkeit an den subgingivalen, bukkalen und crevicalen Epithelzellen, den Zahnwurzeln und Erythrozyten anzuheften, ist ein entscheidender Schritt für die erfolgreiche Einnistung in der Mundhöhle (Cutler et al. 1995; Pavloff et al. 1995). Dazu macht sich der Keim eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, z.B. eine Reihe von Proteinasen, Fimbrien, Hämagglutinationsfaktoren, extrazelluläre Vesikel, Lipopolysaccharide und Polysaccharidkapseln zu Nutze (Cutler et al. 1995; Imamura et al. 1995; Travis et al. 1997).

Als gramnegatives Bakterium besitzt *Porphyromonas gingivalis* ein Lipopolysaccharid (LPS) an der äußeren Zellmembran. Das LPS hemmt die Chemotaxis und somit die Immunantwort bei Keiminvasion (Lamont und Yilmaz 2002).

Fimbrien und Außenmembranvesikel haben die Vermittlung der Adhärenz zu anderen bakteriellen Spezies und zu oralen Epithelzellen gezeigt. Die Fimbrien sind 0,3 - 3,0µm lang und ca. 5 nm breit (Naito und Gibson 1996). Der parodontopathogene Keim besitzt zwei unterschiedliche Arten von Fimbrien, die sich in ihrer Größe von 67kDa und 72kDa unterscheiden (Lamont et al. 1998). Die Bindungsfähigkeit der Fimbrien wurde zu Speichelmolekülen, Prolin reichen Proteinen, Prolin reichen Glykoproteinen, oralen Epithelzellen, oralen Streptokokken, Fibrinogen und Fibronectin nachgewiesen (Weinberg und Belton 1997). Der erste Schritt zur periodontalen Zerstörung (Cutler et al. 1995; Nakayama et al. 1996 Travis et al. 1997). Hierbei handelt es sich um einen Schlüsselfaktor bei der initialen Interaktion zwischen *Porphyromonas gingivalis* und den humanen oralen Epithelzellen.

Diese steuern direkt zum initialen Attachment der Spezies an die Epitheloberfläche der Mukosa bei (Potempa et al. 2000). *Porphyromonas gingivalis* besitzt damit die Fähigkeit, in Epithelzellen einzudringen. Shah und Gharbia (1992) beobachteten dies bei gingivalen Epithelzellen, Taschenepithel und anderen oralen Epithelzellen.

Dabei kommt es zuerst zu einem flüchtigen Kalziumanstieg, und dann zu einer Tyrosin-Phosphorylierung eines Proteins innerhalb der Zelle (Lee et al. 1993).

Eine Polysaccharidkapsel schützt den bakteriellen Organismus vor der Phagozytose durch die polymorphnukleäre Leukozyten. Der Keim kann die Expression dieser Faktoren in Abhängigkeit der Reaktion der Umwelt regulieren (Cutler et al. 1995).

Auch die lokale und systemische Immunreaktion des Wirtes auf die Anwesenheit dieser Organismen und deren Gewebedestruktionen, scheint ein wichtiger Faktor in der Schwere der Erkrankung zu sein (Van Dyke und Seran 2003; Schenkein et al. 1995; Teng 2003). Es gibt einen Zusammenhang zwischen dem Fortschreiten und der Zunahme der Abwehrreaktion gegen bakterielle Infektionen (Genco 1984).

Ein schon genannter erkennbarer Besitz dieses Organismus, ist die Expression potenter Proteasen (Kuramitsu 1998). *Porphyromonas gingivalis* synthetisiert wenigstens acht verschiedene Endopeptidasen, dazu Exopeptidasen die sich aus Cystein-, Serin-, und Metallo-Peptidasen zusammensetzen (Potempa et al. 2000). Diese bakterieneigenen Enzyme bauen Immunglobuline, Komplement, Kollagen und Bindegewebssubstanz ab (Kornman 1988; Tokuda et al. 1996).

Auch Zellen und Botenstoffe werden durch die Invasion beeinträchtigt. So wird die Interleukin-8-Sekretion durch das Eindringen des Keimes inhibiert. Die Migration von Leukozyten an die Bakterien wird behindert und somit die Phagozytoseaktivität herabgesetzt (Eick et al. 2000). Die dadurch resultierende Zunahme an bakteriellem Wachstum führt zu einem erneuten Ausbruch der parodontalen Erkrankung.

Die Verfügbarkeit an essentiellen Nährstoffen in den Zahnfleischtaschen sind wichtige Indikatoren für das Wachstum des Keimes. *Porphyromonas gingivalis* ist ein assaccharolytischer Keim, der u.a. Peptide als Nährstoffe benötigt. Er ist in der Lage die benötigten Stoffe aus der Sulcusflüssigkeit aufzunehmen. Er verwertet Aminosäuren, wie die Asparaginsäure und Asparagin, um Succinat zu erhalten.

Außerdem spaltet der Keim Substrate wie Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin und Keratin.

Ein weiteres wichtiges Substrat für die Ernährung von *Porphyromonas gingivalis* ist das Häm. Um den Eisenbedarf zu decken, verwendet der Keim Hämin, welches mittels des bakterieneigenen Hämolysins für die Bildung des Hämatins notwendig ist (Olsen et al. 1999). Hämin ist in einer Reihe von Stoffen enthalten. Zu nennen sind zum Beispiel Hämoglobin, Haptoglobin, Myoglobin, Albumin und das Cytochrom C.

Das schwarzpigmentierte Aussehen erhält der Keim durch Anlagerung des Hämins an die Zelloberfläche. Außerdem begünstigt membrangebundenes Hämin das anaerobe Milieu des Bakteriums (De Carlo und Harber 1997).

Zur Bindung an die Rezeptoren der menschlichen Zellen nutzt er einen weiteren Virulenzfaktor, das Hämagglutinin. *Porphyromonas gingivalis* produziert mindestens fünf verschiedene hämagglutinierende Moleküle, die die bakterielle Kolonisation durch Bindung an die Zellen unterstützen.

Die größte Bedeutung für die Virulenz von *Porphyromonas gingivalis* besitzen die Cysteinproteinasen, auch Gingipaine genannt. Innerhalb der von *Porphyromonas gingivalis* synthetisierten Proteinase konnte man, basierend auf der Primärsequenz innerhalb der Cysteinproteinasen, die Gruppe der Gingipaine als separate Familie beschreiben (Potempa et al. 1995). In der späteren Kristallstrukturanalyse ließ sich dieses zusätzlich bestätigen (Banbula et al. 1998). Diese Cysteinendopeptidasen sind für mindestens 85% der gesamten proteolytischen Aktivität sowie 100% der sogenannten trypsinartigen Aktivität verantwortlich (Imamura 2003).

Isoliert wurden zwei Arginin spezifische Proteasen (Rgp oder Arginin-Gingipain) (Nakayama et al. 1995, 1996) und die Lysin spezifische Protease (Kgp oder Lysin-Gingipain) (Zuxiong et al. 1992; Bedi 1994). R-Gingipaine, in ihrer vesikulär gebundenen Form, sind vor allem bei der Adhärenz an andere Bakterienspezies, Wirtszellen und extrazelluläre Matrixproteinen beteiligt (Ellen et al. 1997). Kgp hat eine Bindungsaffinität zu Hämoglobin, die durch aktive Domänen vermittelt werden, welche nicht mit der Proteinaseaktivität identisch sind. Das Enzym besitzt entsprechend seiner Domänen auch eine Hämagglutininaseaktivität (Kubinowa et al. 1998). Außerdem sind K-Gingipaine in der Lage, Proteinsubstrate wie BSA, Casein,

säuregelöstes Typ-I-Kollagen der humanen Plazenta, humanes IgG und IgA zu hydrolisieren (Curtis et al. 2001).

Das Enzym scheint spezifisch für die Aufhebung des Gerinnungspotentials von Fibrinogen zu sein und würde dann die Blutungsneigung sowie einen anhaltenden inflammatorischen Effekt in von *Porphyromonas gingivalis* infizierten Parodont nahe legen (Imamura et al. 1995).

Benannt werden die Proteasen nach dem Ort ihrer Spaltung. So spaltet Rgp bei Vorhandensein eines Arginin am C-terminalen Ende eines Proteins und Kgp baut Proteine ab, wenn sich an der entsprechenden Position ein Lysin befindet (Potempa et al. 1997).

Drei Gene sind für die Bildung der mindestens fünf verschiedenen Enzyme verantwortlich. Das Gingipain R1-Gen (rgpA oder auch rgp1) und das Gingipain R2-Gen (rgpB oder auch rgp2) für die Arginin spezifischen Cysteinproteasen sowie für die Lysin spezifische Protease, das Gingipain K-Gen (kgp) (Curtis et al. 2001).

Betrachtet man die Virulenz der einzelnen Cysteinproteasen, so differiert diese sicherlich. Zumindest konnte man diese Annahme im Versuch mit Mäusen bestätigen. Dort ergab sich in einem Parodontitismodell folgende Virulenzabfolge: $Kgp \leq RgpB \leq RgpA$. Ein solches Modell ist aufgrund von mikrobiologischen und immunopathologischen Ähnlichkeiten zum Menschen durchaus nicht ohne Belang und mit aller gegebenen Zurückhaltung auf den Menschen in gewissen Grenzen übertragbar (Pathirana et al. 2007). Diese Gene, welche als Proteinase-Adhäsion-Komplexe wirken, kodieren jedoch nur ein Proenzym, das im Anschluss noch einer Prozessierung unterzogen werden muss (Kuramitsu 1998).

Erst vor Kurzem fand man ein neues Protein namens SOV, das wohl für den Sekretionsmechanismus von Gingipainen von Bedeutung ist. Wodurch die Vermutung, es mit einem besonderen sekretorischen Weg zu tun zu haben, bestätigt wird (Saiki und Konishi 2007).

Die Angaben zu den Molekülgrößen der Gingipaine schwanken zwischen 50-100kDa (Pike et al. 1994). Bedi (1995) wies nach, dass Rgp für die Anwesenheit des ausgereiften Kgp unerlässlich ist, wobei bei rgp-null Mutanten ein abnormales Kgp nachzuweisen war.

Die Gene rgpA und kgp besitzen eine identische katalytische Domäne (Pavloff et al. 1997). Sie werden beide C-terminal durch eine Carboxypeptidase (CPG70) weiterverarbeitet (Veith et al. 2004).

Auch konnte man bei beiden Genen, im Gegensatz zum rgpB- Gen eine hämagglutinierende Domäne finden (Nakayama 1997).

Neben der Veränderung der Abwehrmechanismen des Wirtes durch den Abbau einer Reihe von physiologischen Proteinen und der Triggerung der direkten Gewebsinvasion, besteht die Hauptaufgabe der Proteinasen darin, Peptide für das Wachstum des Bakteriums bereitzustellen (Tokuda et al. 1996). Naito et al. (1996) fanden heraus, dass freiliegende Kollagenmoleküle auf der Basalmembran unverzichtbar für die Manifestation des Keimes sind.

Eine weitere Möglichkeit ist die Einteilung der Proteinase des Bakteriums nach ihrer Wirkungsrichtung. Kuramitsu et al. (1995) unterscheiden die nach innen gerichtete Wirksamkeit wie Regulation der Expression von Proteinase und Proteinaseprozessing, Wachstumsrate, Proteinprozessing der äußeren Membran und die Expression von Fimbrien, von den nach außen gerichteten Aufgaben. Hierfür sind die Bindung zu eukaryotische Zellen und gram positiven Bakterien, die Antikörperzerstörung, die Veränderungen der Zytokinrezeptoren, die Einschränkung der neutrophilen Granulozytenaktivität aber auch die Gefäßdurchlässigkeit, die Gerinnung, die Komplementaktivierung und die Hämagglutination zu nennen. Eine Arbeit von Abe und Kadowaki (1998) beschreibt im speziellen die Aktivierung oder Inaktivierung von Komplementfaktoren und Zytokinen, die Aktivierung der Kallikrein-Kininkaskade, den Abbau von extrazellulären Matrixproteinen, die Inaktivierung von Proteinaseinhibitoren im Plasma und die Spaltung der Rezeptoren an der Zelloberfläche. Der Effekt dieser unkontrollierten Proteolyse sind die Entwicklung von Ödemen und die Schmerzentstehung durch Induktion der Umwandlung von Kininogen in Bradykinin sowie Aktivierung von Kallikrein mittels KGP und RGP (Hinode et al. 1992, 1996).

Vermehrte Blutungsneigung ist Folge einer Degradation von Fibrinogen durch beide Cysteinproteinase. In vitro können diese Gingipaine Fibrinogen innerhalb von Minuten abbauen und somit dessen Koagulation verhindern (Pike et al. 1996). Zudem waren diese Enzyme in der Lage Fibrinogen aufzulösen. Die Fähigkeit der lysinspezifischen Proteasen, die Koagulation von reinem Fibrinogen außer Kraft zu setzen, ist geringer als die der argininspezifischen Proteasen (Kaminishi und Cho 1993). Dennoch haben die lysinspezifischen Proteasen die Plasmaperinnungszeit wirksamer als die argininspezifischen Proteasen verlängert, was darauf hindeutet, dass die Wechselwirkung lysinspezifischer Proteasen mit dem Fibrinogen im Plasma spezifischer ist (Imamura et al. 1995).

Viele Beobachtungen unterstützen die Theorie, dass *Porphyromonas gingivalis* auch über einen parazellulären Weg Zugang zu den tieferen Strukturen des Bindegewebes dadurch gewinnt, dass epitheliale interzelluläre Adhäsionsmoleküle abgebaut werden oder dass die Zytoskelette der Wirtszellen entsprechend moduliert werden. Gingipaine können diese Mechanismen wohl auch darüber fördern, dass sie auf der Epithelzelloberfläche die Abstoßung des Zelloberflächenproteoglykans Syndecan-1 fördern. Syndecan-1 funktioniert als Korezeptor für verschiedene Wachstumsfaktoren und Matrixmoleküle wie basic fibroblast growth factor (bFGF), Kollagen und Fibronektin. Solch ein Abstoßungsprozess kann ebenso eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Invasion des Parodontalgewebes und der Modulation der Wirtsabwehr spielen (Andrian et al. 2006).

Durch Beeinflussung der Immunantwort gelten die Cysteinproteinasen sowohl als entzündungsfördernd als auch entzündungshemmend. Einen Einfluss auf die Wirtsabwehr besitzen isoliertes Rgp und Kgp durch Spaltung von Ig G, Serum-IgA und sekretorischem IgA (Hinode und Masuda 1996). Der Abbau der genannten Antikörper beeinträchtigt nicht nur die spezifische Immunantwort, sondern durch die verminderte Opsonierung wird auch die Phagozytose gestört.

Unterstützt wird die Entzündungsreaktion zum einen durch Aktivierung der Komplement C5-Reaktion. RGP baut C5 zu C5a ab und fördert durch die chemotaktischen Eigenschaften von C5a die Leukozytenakkumulation. Zum zweiten wird die Prekallikreinumwandlung in Kallikrein ausgelöst und daraufhin hochmolekulares Kininogen in Bradykinin umgewandelt (Jagels et al. 1996). Das Rgp spaltet das C3-Komplement, verhindert so die Produktion von C3-abhängigen Opsoninen und erschwert somit die Phagozytose von *Porphyromonas gingivalis* durch polymorphkernige Granulozyten (Schenkein et al. 1995). Untersuchungen von Jagels et al. (1996) zeigten auch, dass bestimmte Proteinase die Rezeptoren der Granulozyten veränderten oder auch zerstörten. Eine spezifische Aufgabe des Kgp ist die Inaktivierung des C5a-Rezeptors. Durch Bindungsstudien an intakten Granulozyten wurde nachgewiesen, dass pro Zelle 100-300 000 C5a-Rezeptoren existieren. Die Bakterizide der neutrophilen Granulozyten können auf diese Weise gehemmt werden. Auch die Gruppe um Popadiak (2007) fand heraus, dass diese Proteasen eine Schlüsselrolle in den Ausweichstrategien dieser Spezies gegenüber der Immunantwort des Wirtes spielen. *Porphyromonas gingivalis* erwies sich als äußerst resistent gegenüber dem Abwehrfaktor Komplementsystem (Popadiak et al. 2007). Vermutlich verursacht Gingipain R in der flüssigen Phase eine Komplementsystemaktivierung. Dadurch würden sich die

Voraussetzungen, durch den Komponentenverbrauch, für eine Bakteriolyse durch Komplementaktivierung auf der Bakterienoberfläche verschlechtern.

Mikolajczyk-Pawlinska et al. (1996) zeigten, dass der Abbau von Interleukin 8 (IL8) durch Cysteinproteinasen eine Inhibierung von neutrophiler, transepithelialer Migration zur Folge hat. Die antibakterielle Wirkung der neutrophilen Granulozyten wird somit beeinflusst. Andererseits induziert die Proteinase Rgp die verstärkte IL8-Synthese (Oido-Mori et al. 2001). Zusätzlich ist bekannt, dass Rgp durch Hydrolysieren von Peptidbindungen an der direkten Zerstörung des Zahnfleisches beteiligt ist (Yamamoto 1995).

Es konnte jedoch auch ein Zusammenhang zwischen hämagglutinierenden Eigenschaften und den Cysteinproteinasen hergestellt werden (Bedi 1994). So enthalten vor allem die Gene *rgpA* und *kgp* jeweils eine Domäne für Hämagglutinin (Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998). Die Arginin spezifischen Cysteinproteinasen sind bei der Regulation der Reifung von zahlreichen Zelloberflächenproteinen beteiligt. Neben den Hämagglutininen fanden Umemoto und Naito (1996) das Hämoglobinrezeptorprotein und *fim A* Fimbrien, einer Untereinheit der Hauptfimbrien, und 75kDa Protein, eine Untereinheit der Nebenfimbrien. Dabei sind sowohl *rgpA* und *rgpB* bei der Entstehung und Ausbildung von Fimbrien involviert. Erst bei einer Doppelmutation dieser beiden Gene liegt eine nahezu fimbrienfreie Form des Keimes vor (Nakayama et al. 1997). Kuboniwa et al. (2001) impften Mäusen einen DNA-Impfstoff, der diese vor einer Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* schützte. Mit diesen Antikörpern (anti- Rgp IgG und anti- Kgp IgG) konnte ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf Lysin und Arginin spezifische Aktivitäten sowie das Wachstum von *Porphyromonas gingivalis* gezeigt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, diese Enzyme sind erforderlich für das normale Wachstum des Keimes und für die Expression der Virulenzdeterminanten. Sie besitzen damit Effekte an, einmal der zellulären und auch humoralen Immunität. Sie aktivieren Wirtsproenzyme und Deaktivieren Wirtsproteine und vermögen außerdem die Kolonisationsaktivitäten des Organismus an verschiedenen Stellen zu modulieren (Kuramitsu 1998).

Lamont und Jenkinson (1998) fassten die wesentlichen Funktionen der Cysteinproteinasen wie folgt zusammen:

1. Zerstörung der Gewebseinheit durch

- Zerstörung extrazellulärer Matrixproteine
- Hydrolyse von Kollagen I, III, IV, V
- Zerstörung von Fibrinogen
- Inaktivierung von Plasma- und Gewebsproteinaseinhibitoren

2. Störung der Wirtsabwehr durch

- Zerstörung von Immunglobulinen
- Inaktivierung oder Aktivierung von Komplement-Komponenten
- Zerstörung von Zytokinen
- Spaltung von Leukozytenoberflächenproteinen

3. Bakterielle Funktion

- Freisetzung von Hämin und Eisen aus Wirtsproteinen
- Exposition von Wirts- und bakteriellen Kryptitopen
- Posttranskriptionelles Prozessing von Proteasen und Fimbrillin
- Intrazelluläre Invasion

Klinische Bedeutung

Ein Gleichgewicht zwischen bakteriell bedingten Schädigungen gingivaler Strukturen und reparativen und regenerativen Gewebeantworten erhält die klinische Integrität der parodontalen Gewebe aufrecht. Veränderungen dieses Gleichgewichts jedoch, wie lokale oder systemische Gewebebeeinflüsse bzw. qualitative und quantitative Umgruppierungen der oralen Mikroflora führen zu ernsten Läsionen. Periodische Veränderungen des Gleichgewichts zwischen Mikroorganismen und Abwehrmechanismen münden in die so genannten aktiven Phasen des Gewebezusammenbruchs, die zur Progression der Erkrankung führen (Socransky et al. 1998).

Der Wirkungsort von *Porphyromonas gingivalis* ist die Mundhöhle, eine einzigartige anatomische Struktur im Körper des Menschen.

Sie ist zusammengesetzt aus zahlreichen epithelialen und mukosalen Oberflächen, sowie harten verkalkten Geweben (Cutler et al. 1995). Diese Strukturen werden ständig von einem, von Drüsen sezernierten, Speichel umhüllt und gereinigt.

Darin enthalten sind eine variable Anzahl von Mikroorganismen und Nahrungsmittel. Das Volumen steigt mit der Entwicklung der periodontalen Erkrankung (Cutler et al. 1995).

Die von *Porphyromonas gingivalis* hervorgerufene Erkrankung wird als Parodontitis bezeichnet. Die Parodontitis ist eine Erkrankung des Zahnhalteapparates, das heißt des Parodontiums. Das Parodontium umfasst neben dem Zahnfleisch (Gingiva), die Zahnwurzelhaut (Desmodont), den Wurzelzement und den umgebenden Alveolarknochen. Die Parodontitis ist eine nichtobligate Gingivitisfolge.

Eine bis zum Ende der 90iger Jahre des letzten Jahrhunderts gültige Klassifikation der Parodontitiden, die sich nach dem Lebensalter des Auftretens sowie der Progressionsrate richtete wurde durch die auf dem „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ im Jahre 1999 erstellte Klassifikation der periodontalen Erkrankungen und Zustände aufgegeben.

Nach der zur Zeit gültigen Nomenklatur werden nun folgende Formen der Parodontitis unterschieden (Armitage und Gary 1999):

1. chronische Parodontitis
 - A. lokalisierte chronische Parodontitis
 - B. generalisierte chronische Parodontitis
2. aggressive Parodontitis
 - A. lokalisierte aggressive Parodontitis
 - B. generalisierte aggressive Parodontitis
3. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
 - A. assoziiert mit hämatologischen Störungen
 - a. erworbene Störungen
 - b. Leukämie
 - c. Andere
 - B. assoziiert mit genetischen Störungen
 - z.B. Down-Syndrom, Papillon-Lefevre- Syndrom, Cohen-Syndrom
 - C. nicht anderweitig spezifiziert
4. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
 - A. nekrotisierende ulzerative Gingivitis

- B. nekrotisierende ulzerative Parodontitis
- 5. Abszesse des Parodontiums
 - A. Gingivalabszess
 - B. Parodontalabszess
 - C. Perikoronaler Abszess
- 6. Parodontitis assoziiert mit endodontalen Läsionen
 - A. kombinierte parodontal-endodontische Läsionen
- 7. Entwicklungsbedingte oder erworbene parodontale Deformitäten oder Zustände
 - A. Lokalisierte zahnbedingte Faktoren, die zu plaque-induzierten gingivalen oder parodontalen Erkrankungen prädisponieren
 - B. Peridentale mukogingivale Deformitäten oder Zustände
 - C. Mukogingivale Deformitäten oder Zustände im zahnlosen Kiefer
 - D. Okklusales Trauma

Entzündungen der Gewebe der Mundhöhle sind eine der häufigsten allgemeinen Erkrankungen des Menschen. Der Befall an Parodontitis beträgt zum Beispiel bei den Marburger Zahnmedizinstudenten der Vorklinik im Alter von 18-29 Jahren 42% (Ketterl 1990). Lange und Schwöppe (1981) fanden eine Parodontitis bei 98,5% der 20-Jährigen Rekruten. Wingerath und Lange (1982) stellten sogar bei 100% der 35-Jährigen Bevölkerung eine solche Erkrankung fest. In der Bundesrepublik Deutschland ist die Parodontitis mit 27,3% bei den über 40-Jährigen immerhin die häufigste Ursache für Zahnextraktionen, deutlich vor der Karies mit 20,7%. Mit 18,7% folgt die kombinierte Indikation aus Parodontitis und Karies (Reich und Hiller 1993).

Diese Zahlen sind teilweise vergleichbar mit Werten aus epidemiologischen Studien anderer Länder und bestätigen, dass das Vorkommen der Gingivitiden und die Schwere der Parodontitiden mit dem Alter zunimmt (Williams 1997). Brown und Loe (1993) konnten allerdings nur bei 14-16% der untersuchten Probanden, die älter als 45 Jahre waren, Taschen mit einer Tiefe von 6mm und mehr feststellen. Nur bei 4% dieser Personen wurden drei oder mehr solcher Taschen diagnostiziert.

Lange Zeit wurde die Parodontalerkrankung als kontinuierliches, chronisch verlaufendes Geschehen angesehen. Typisch für den Verlauf sind Progression, Stagnation und Remission.

Arbeiten von Merte (1992) wie auch später von Landi und Salomon (1997) zeigen, dass eine Gingivitis (Entzündungen des Zahnfleisches) sehr lange bestehen kann, ohne dass eine Parodontitis entsteht.

Schenkein et al. (1995) beschreiben die Parodontitis als eine Erkrankung der Stützstrukturen der Zähne, gekennzeichnet durch akute progressive Läsionen des Zahnfleischverbindungs-gewebes, exzessive leukozytäre Infiltrationen und das Vorkommen einer charakteristischen Mikroflora.

Ein anderes Charakteristikum der Parodontitis ist die Neigung der infizierten Stellen zur Blutung (Travis et al. 1997). Mühlemann und Son benutzten das Initialsymptom des Auftretens von Blutungen aus dem Sulcusbereich bei einer Gingivitis und marginalen Parodontitis, besonders im Approximalraum, für die Entwicklung eines Index:

BOP = bleeding on probing.

Klinisch wird der Status der Parodontitis mit Hilfe dieses Indexes an vier bis sechs Punkten eines Zahnes erhoben und der Entzündungsgrad bestimmt. Wichtigstes Kriterium dieser Erkrankung ist das Vorhandensein von Zahnfleisch- und Knochentaschen sowie der Attachmentverlust zwischen Parodont und dem Zement des Zahnes. Bezeichnend für eine Parodontitis sind zwei Messpunkte des klinischen Attachmentlevels von mindestens 6 mm und eine Taschentiefe von 5 mm (Schwenzer 1987). Gemessen wird hierfür der Verlust zwischen der Schmelz- Zementgrenze und der bindegewebigen Anheftung. Diagnostische Methoden sind das Messen der Taschentiefe mit konventionellen Messsonden aber auch röntgenographische Verfahren (Brown und Loe 1993; Ketterl 1990).

Neben schweren lokalen Symptomen haben jüngste epidemiologische Studien gezeigt, dass diese Infektion auch systemische Konsequenzen haben kann, so koronare Erkrankungen. Bei einer Vielzahl von Untersuchungen um den durch die Bakterien bewirkten Zelladhäsionsverlust, kommt für diese besondere Apoptoseform ein spezieller Begriff ins Spiel, die sogenannte „Anoikis“. Diese wird gerade durch die Zelladhäsionsverluste und dem Verlust von Integrinsignalen getriggert und wurde bis jetzt noch nicht vollständig charakterisiert (Frisch und Francis 1994). Die Anoikis wird interessanterweise bislang mit pathologischen Prozessen wie kardiovaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht (Michel 2003; Sheets et al. 2005). Die Gesundheitsforschung in den letzten Jahren ein

besonderes Augenmerk auf die Ätiologie periodontaler Erkrankungen gelegt (Kuramitsu 1998).

Kuramitsu (1998) fasste die für die Ätiologie wichtigen Faktoren zusammen:

- exogene Faktoren (Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte in der Plaque sowie sekundäre Faktoren, welche die Ansammlung von Mikroorganismen begünstigen)
- allgemeine Ursachen (endogene Störungen) und
- sogenannte „Host-response“ (Antwort des Wirtes), welche eine Anzahl von wichtigen immunologischen und systemischen Komponenten beinhaltet.

Es ist generell akzeptiert, dass diese Erkrankung von der Kolonisation der subgingivalen Zone durch anaerobe gramnegative Bakterien resultiert. Neben *Porphyromonas gingivalis* nehmen dabei auch weitere Keime, so *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticula* und andere orale Spirochäten eine wichtige Rolle ein (Wingrove et al. 1992; Schenkein et al. 1995; Genco et al. 1996).

Unterscheiden kann man bei der bakteriell bedingten entzündlichen Reaktion des Parodonts vier verschiedene Läsionen: initiale Läsion, frühe Läsion, etablierte Läsion und fortgeschrittene Läsion. Diese stellen die Progression des destruktiven Geschehens dar. Die initiale Läsion stellt sich durch eine Vaskulitis, eine Exsudation, die Migration von Leukozyten, das Auftreten von Serumproteinen, die Veränderung des Sulkusbodens und einen Verlust der Gefäßkollagenumrandung dar. Bei der frühen Läsion kommt es zu einer Verstärkung der Vorgänge, einer Ansammlung von Lymphozyten, einer Fibroblastenschädigung, einem Attachmentverlust und zur Proliferation des Saumeithels.

Die etablierte Läsion ist gekennzeichnet durch das Fortbestehen der akuten Entzündung, das Vorkommen von Plasmazellen, das Auftreten von Immunglobulinen, des weiteren Verlustes von Bindegewebe und einer Tiefenwanderung des Saumeithels (Taschenbildung). Die fortgeschrittene Läsion beinhaltet letztlich das Fortbestehen der entzündlichen Veränderungen, eine Ausdehnung der Erkrankung, ein Fortschreiten des Kollagenabbaus, das Auftreten von veränderten Plasmazellen, Destruktionsprozesse im Alveolarknochen, die Umwandlung von Gewebe und die Ausdehnung der entzündlichen und immunpathologischen Gewebereaktionen (Ketterl 1990).

Erworbene und genetische Risikofaktoren beeinflussen ebenfalls die entzündliche Immunreaktion und den Stoffwechsel des Knochens (Reinhardt et al. 1999). Risikofaktoren im Zusammenhang mit der Entstehung einer Parodontitis können sein: Tabakrauchen, Stress, fortgeschrittenes Alter, Rasse und Vererbung, systemische Erkrankungen, eingeschränkte Wirtsabwehr, vernachlässigte Mundhygiene und unregelmäßige Zahnarztbesuche.

Systemische Ursachen begründen sich, neben den o.g., auch in immunologischen Defekten und endokrinologischen Dysfunktionen (Hart et al. 1994). Umwelteinflüsse gelten als äußere Risikofaktoren wie die Ernährung, die Einnahme von bestimmten Pharmazeutika und Alkohol (Ronderos et al. 2000).

Weitere lokale Risikofaktoren werden in Plaqueretentionsstellen, anatomisch ungünstige Gegebenheiten und traumatische Einflüsse gesehen. Die Korrelation zwischen Plaque und Parodontalerkrankungen kann in einer Gleichung dargestellt werden (Lindhe 1983):

$$\text{Parodontitis} = \text{Alter des Patienten} \times \frac{\text{Plaque}}{\text{Host response}}$$

Dabei stellt sich die Pathogenese der Parodontitis folgendermaßen dar (Page 1999): Antigene, Lipopolysaccharide der Mikroflora in einer gingivalen Plaque, lösen eine entzündliche Immunantwort des Wirtes aus. Hierbei stellt die Bildung von Antikörpern eine reaktive Antwort auf die Antigene der Mikroflora dar. Polymorphnukleäre Leukozyten sind essentiell für die unspezifische Immunantwort zuständig, die Phagozytose. Als Folge der entzündlichen Immunantwort können Zytokine, Prostaglandine und Matrix-Metalloproteinasen vermehrt freigesetzt werden. Der Stoffwechsel des Knochens wird durch Zytokine und Prostaglandine sowie Matrix - Metalloproteinasen beeinflusst. Der alveoläre Knochen wird abgebaut und es kommt zur Auflösung der interstitiellen Matrix. Diese Abbauvorgänge bestimmen wiederum die klinischen Zeichen der Erkrankung.

Etwas allgemeiner lässt sich formulieren, dass sich die Anfälligkeit des Wirtes für eine Parodontitis aus dem Zusammenspiel zwischen Bakterien, dem Wirt und Umweltfaktoren ergibt (Seymour und Taylor 2004).

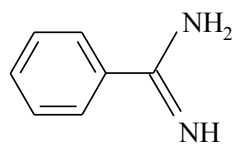
2.3. Beschreibung ausgewählter Proteinaseinhibitoren

Bei den Untersuchung wurden Inhibitoren eingesetzt, welche in der Arbeitsgruppe von J. Stürzebecher (Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Standort Erfurt) entwickelt und in ihrer Aktivität auf die reinen Arginin spezifischen Cysteinproteinasen geprüft wurden.

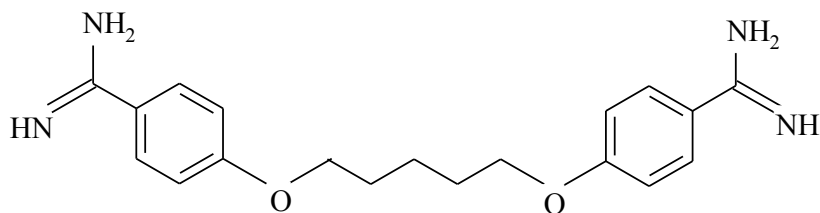
Hierbei wurden sieben Substanzen (Inhibitor 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9) aus insgesamt zehn Substanzen auserwählt.

Die zu prüfenden Inhibitoren waren Pentamidin (Inhibitor 9), drei Bisbenzamidinderivate mit Pentamidin-ähnlicher Struktur (Inhibitor 1, 4, 6), ein Bisbenzamidderivat mit einer anderen Struktur (Inhibitor 2), ein einfaches Benzamidderivat (Inhibitor 7) und ein Argininderivat (Inhibitor 3).

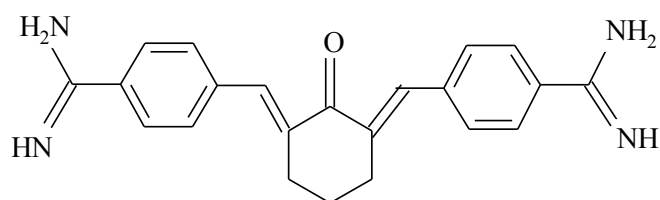
In Abbildung 1 sind die chemischen Strukturen von Benzamidin, Pentamidin und Inhibitoren mit Pentamidin-ähnlicher Struktur dargestellt.



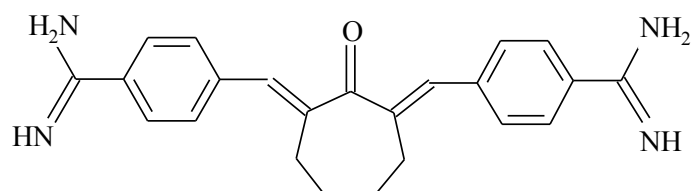
Benzamidin



Pentamidin



Inhibitor I



Inhibitor VI

Abb. 1
Chemischen Strukturen von Benzamidin, Pentamidin und Inhibitoren mit Pentamidin-ähnlicher Struktur

Bei Pentamidin, einem Derivat von Benzamidin, handelt es sich um eine schon bekannte Substanz, die bei der Behandlung von Toxoplasmose und Infektionen mit *Pneumocystis carinii* eingesetzt wird. Der Wirkmechanismus des Pentamidins besteht aus dem Eingriff in den Folsäuremetabolismus, der Störung der DNA-, RNA- und der Proteinsynthese. Das Argininderivat hatte keine Aktivität auf die arginin-spezifischen Cysteinproteinasen und stellte damit eine Kontrollgruppe dar.

Zum Zeitpunkt der Testung war die genaue Struktur der Substanzen und die Gruppenzugehörigkeit nicht bekannt. Auch war nicht bekannt, dass es sich bei einem Inhibitor um eine Kontrollgruppe handelte.

Es wurde prinzipiell mit den Nummern aus den Erfurter Vorversuchen gearbeitet und die Versuche somit als Blindstudie durchgeführt.

3. Ziele der Arbeit

Die bedeutende Rolle der subgingivalen gramnegativen Plaqueflora für Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis wurde in zahlreichen Untersuchungen belegt (Moore et al. 1982; Pfister et al. 1982, 1987, 1998; Socransky et al. 1984).

Als einer der wichtigsten Erreger gilt das gramnegative Bakterium *Porphyromonas gingivalis* (Slots et al. 1982). Diese Keimart besitzt zahlreiche Cystein- Proteinasen mit Trypsin-ähnlicher Aktivität (Nakayama et al. 1995), die bereits isoliert und biochemisch charakterisiert sind. Die vorliegenden Daten zeigen, dass diese Enzyme potente Virulenzfaktoren darstellen (Cutler et al. 1995; Nakayama et al. 1995). Diese Enzyme, Gingipaine genannt, bauen physiologisch wichtige wirtseigene Enzyme ab, unterbrechen damit die Abwehr des Wirtes und bilden durch Ausbildung und Reifung von Fimbrien eine wichtige Voraussetzung für die bakterielle Adhärenz an Epithelzellen.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte untersucht werden, ob es möglich ist, durch Einsatz synthetischer Proteinaseinhibitoren eine Blockierung der Gingipaine und dadurch eine Reduktion der Virulenz des *Porphyromonas gingivalis* zu erzielen.

In der Arbeitsgruppe des Zentrums für Vaskuläre Biologie und Medizin der FSU Jena (Außenstelle Erfurt) wurden Proteinaseinhibitoren von Benzamidintyp entwickelt, die als Thrombinhemmer auch eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität der Arginin spezifischen Cysteinproteinasen entfalten.

Durch die vorgesehenen Untersuchungen sollte anhand des Referenzstammes *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 geklärt werden, ob Proteinaseinhibitoren in der Lage sind, die Fähigkeit der Spezies zu Adhärenz an und Internalisierung in Parodontalzellen negativ zu beeinflussen.

In weiteren Versuchen sollte die Wirkung der Proteinaseinhibitoren auf die Hämagglutination nachgewiesen werden. Insgesamt sollten sieben Inhibitoren in die Testung des Referenzstammes *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 und des *Porphyromonas gingivalis* Stammes JH-16-1, einem klinischen Isolat, einbezogen werden.

4. Materialien

4.1. Testkeime

Die Adhärenz- und Internalisierungsversuche wurden mit einem Bakterienstamm der Spezies *Porphyromonas gingivalis* durchgeführt. Dabei handelte es sich um den Referenzstamm *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, welcher aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ Braunschweig, Deutschland) bezogen wurde. Ein weiterer Stamm (JH 16-1) kam für die Hämagglutinationsversuche zum Einsatz. Der Stamm, wurde aus der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität Jena entnommen. Der Stamm *Porphyromonas gingivalis* JH 16-1 war ein klinisches Isolat und wurde bei einer Patientin mit schwerer chronischer Parodontitis aus der Poliklinik für Konservierende Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abteilung Parodontologie im Verlauf mehrerer Jahre mehrfach nachgewiesen. Molekularbiologische Untersuchungen bestätigten die genetische Identität des *Porphyromonas gingivalis*-Isolates (Eick et al. 2000).

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Bakterienstämme (JH 16-1 und ATCC 33277) auf Schaedler-Agar-Platten mit 8% Schafblut überimpft und anschließend anaerob bei 37°C inkubiert.

4.2. KB-Zellen

Für die durchgeführten Versuche wurde eine permanente Epithelzelllinie (KB-Zellen) verwendet. Die KB-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen, mit Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) und 10% fetalem Kalbsserum (FCS) kultiviert.

Zur Vorbereitung der Versuche wurden die KB-Zellen 24h vor Versuchsbeginn auf Zellkulturplatten mit jeweils 24 Wells passagiert.

4.3. Proteinaseinhibitoren

Die im Versuch verwendeten Proteinaseinhibitoren waren synthetische Inhibitoren vom Benzamidintyp. Sie wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Stürzebecher (Institut für

Vaskuläre Biologie und Medizin, Universitätsklinikum Jena) zur Verfügung gestellt. Die Proteinaseinhibitoren wurden bei -20°C aufbewahrt, vor Versuchsbeginn aufgetaut und in PBS gelöst.

Inhibitor 1	Bisbenzamidinderivat mit Pentamidin-ähnlicher Struktur
Inhibitor 2	Bisbenzamidin
Inhibitor 3	Argininderivat
Inhibitor 4	Bisbenzamidinderivat mit Pentamidin-ähnlicher Struktur
Inhibitor 6	Bisbenzamidinderivat mit Pentamidin-ähnlicher Struktur
Inhibitor 7	einfaches Bisbenzamidinderivat
Inhibitor 9	Pentamidin

4.4. Nährmedien

EMEM-Zellkulturmedium:

(Bio Whittaker, Verviers, Belgien)

10%iges fetales Kälberserum (FCS)

(Firma Gibco BRL, Paisley, UK)

Medium 199:

(Firma Gibco BRL, Paisley, UK) gemischt mit Aqua dest. (Ampuwa) im Verhältnis 1:1

Schaedler-Agar-Platten:

(Firma OXOID, Basingstoke, UK) mit Zusatz von 8% Schafblut

Schaedler-Bouillon:

(Firma OXOID, Basingstoke, UK) mit Zusatz von 8% Schafblut

4.5. Lösungsmittel und Zusätze

Ampuwa:

(Firma Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)

Unter Ampuwa versteht man bidestilliertes, steriles, Pyogen freies Wasser, welches als neutrales Lösungsmittel diene.

0,9%ige Kochsalzlösung

PBS-Lösung:

Phosphate buffered saline (PBS) ist eine sterile, physiologische, phosphatgepufferte NaCl-Lösung. Darin enthalten sind u.a. KCl, Na₂HPO₄, 2H₂O und KH₂PO₄. Der pH-Wert beträgt 7,2. Es wurde für Spül- und Verdünnungsvorgänge genutzt.

2,5%ige Trypsinlösung

Penicillin

Erythrozytensuspension

Defibriniertes Schafblut, Universitätsklinikum Jena, Institut für Versuchstierkunde

4.6. Geräte, Apparaturen, Hilfsmittel

CO₂-Schrank:

(Haereus, Hanau, Deutschland)

Innen-Temperatur 37°C bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5%igem CO₂-Gehalt.

Laminarairflowbox

Fotometer:

(Spekol, Leipziger Arzneimittelwerk, Deutschland)

Das Fotometer diente zur Einstellung der Keimdichte.

Küvetten für Fotometer

Mikroskop:

(Firma Olympus, Deutschland)

Vortex-Gerät REAX-2000:

(Firma Heidolph, Fisher Scientific, Kahla, Deutschland)

Das Vortex-Gerät REAX-2000 wurde benutzt, um verschiedene Lösungen und Suspensionen zu durchmischen.

Absaugpumpe mit einfachem Aufsatz:

Bechergläser, Dosiergefäße, Meßröhrchen

Tischzentrifuge:

(Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Pipetten:

(Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Für den Versuch wurden Eppendorf-Pipetten unterschiedlichen Fassungsvermögen benutzt.

Pipettenspitzen:

Für die Eppendorf-Pipetten wurden Pipettenspitzen unterschiedlicher Größe (Fassungsvolumen 10, 100 bzw. 1000µ) verwendet.

Pipettenständer

24-Well-Gewebekulturflaschen

(Firma Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

250ml-Gewebekulturflaschen

(Firma Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Kunststoffösen

Wattestäbchen

Glasspatel

5. Methoden

Alle in-vitro Versuche wurden mehrfach durchgeführt.

5.1. Durchführung der Untersuchung zur Wirkung der Proteinaseinhibitoren auf Adhärenz und Internalisierung

Alle Arbeitsschritte fanden unter der Laminarairflowbox statt. Es wurden zwei dicht bewachsene Gewebekulturflaschen benötigt. Das Zellwachstum wurde mikroskopisch überprüft. Nach der Kultivierung der Gewebekulturflaschen wurden die KB-Zellen 24 Stunden vor Versuchsansatz auf Wellplatten übertragen. Hierzu wurde das Gewebekulturmedium entfernt und die Flaschen mit PBS-Lösung gewaschen. Unter Zugabe von 5ml 2,5%iger Trypsinlösung und Inkubation von 5-10 min bei 37°C im CO₂-Schränk wurde eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden erreicht. Nach Zusatz von 26ml EMEM-Medium mit 10% fetalem Kälberserum wurde je 1ml in 1 Well der Gewebekulturplatten pipettiert. Daraufhin erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für 24 Stunden bei 37°C in 5% CO₂-Athmosphäre. Mikroskopisch wurde vor Versuchsbeginn geprüft, ob sich eine Monolayerschicht ausgebildet hat. Mit Hilfe von Wattestäbchen wurde ein Abstrich der Bakterien von der Schädler-Agar-Platte entnommen und in ein mit PBS gefülltes Plastikröhrchen gegeben und gelöst. Die gewünschte Bakteriendichte wurde mit dem Fotometer eingestellt. Zur Eichung des Fotometers wurde eine von zwei Küvetten mit 1ml einfach konzentriertem Medium 199 gefüllt, in das Gerät geschoben und dann die Skala bei 640nm auf Null gestellt. Nun wurde in die zweite Küvette 1ml Bakteriensuspension pipettiert und diese fotometrisch mit der ersten verglichen. Die Bakteriensuspension wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,1 vorsichtig verdünnt.

Desweiteren erfolgte die Herstellung von 3 Ansätzen von 20ml in den Konzentrationen 0ml-0,2ml-2ml Proteinaseinhibitor gelöst in PBS-Lösung sowie 2ml Bakterien-Suspension und 16ml EMEM-Medium. Es wurde hiermit die Endkonzentrationen von 0mol/l, 2×10^{-5} mol/l und 2×10^{-6} mol/l erzielt. Nach Absaugen des Mediums von den Zellen erfolgte die Zugabe 1ml der jeweiligen Konzentration in jeweils 8 Wells und die Inkubation für 1 Stunde im CO₂-Schränk. Anschließend wurden die Platten 5mal mit PBS gewaschen. Zur Bestimmung der Adhärenz wurde 1ml eiskaltes Aqua dest. je Well zugegeben.

Nach 15min wurden 0,1ml der Menge entnommen und in 9,9ml 0,9% NaCl pipettiert. Durch Ausspateln auf Schaedler- Agar- Platten und nachfolgende anaerobe Kultivierung für 7 Tage im Brutschrank konnte die Kolonienzahl bestimmt werden. Bei der Bestimmung der Internalisierung wurde den Wells zwecks Abtötung der adhären, aber nicht internalisierten Bakterien 1ml EMEM-Medium mit 0,4mg/ml Penicillin zugesetzt. Danach erfolgt eine weitere Inkubation im CO₂-Schrank über 1,5 Stunden. Nach 3-maligem Spülen mit EMEM-Medium wurde den Platten jeweils 1ml eiskaltes Aqua dest. zugesetzt. Die Ermittlung der Keimzahl der internalisierten Bakterien war nach Zugabe von 0,5ml der Konzentration aus den Wells in 4,5ml 0,9%NaCl analog zur Adhärenz-Bestimmung. Nach einer Bebrütungszeit von 7 Tagen unter anaeroben Milieu konnte das Auszählen der Koloniezahlen erfolgen.

5.2. Durchführung der Untersuchung zur Wirkung von Proteinaseinhibitoren auf die Hämagglutination

Zu den Hämagglutinationsversuchen wurden Schaferythrozyten genutzt. Hierzu wurde zunächst das Schafblut bei 2000U/min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Blut wird zweimal mit PBS gewaschen. Für die Versuche wurde das Sediment 2%ig in PBS angewendet.

Die optische Dichte des zu prüfenden Stammes wurde auf 1,0 bei 660nm eingestellt. Eingesetzt wurden 24h- Kulturen der Porphyromonas gingivalis-Stämme ATCC 33277 und JH 16-1. Zusätzlich wurden die Proteinaseinhibitoren jeweils in einer Konzentration von 2×10^{-5} und 2×10^{-6} zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe des Erythrozytenmediums zu gleichen Teilen. Nach kurzer Durchmischung verblieben die Mikrotiterplatten für 3 bis 4h bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit konnte die Hämagglutination visuell ermittelt werden.

5.3. Statistik

Die Statistik der Adhärenz und Internalisierung erfolgte durch den Wilcoxon-Test. Bei der Interpretation der beiden Tests wurde eine α -Adjustierung nach Holm durchgeführt. Hierbei wurde jeweils ein Inhibitor mit der Kontrollgruppe verglichen.

6. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von Proteinaseinhibitoren auf die Adhärenz an und Internalisierung in KB-Zellen werden in Form von Abbildungen und Tabellen dargestellt. Dabei finden sich die Tabellen mit den Einzelwerten im Anhang.

6.1. Untersuchung zur Wirkung von Proteinaseinhibitoren auf die Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis*

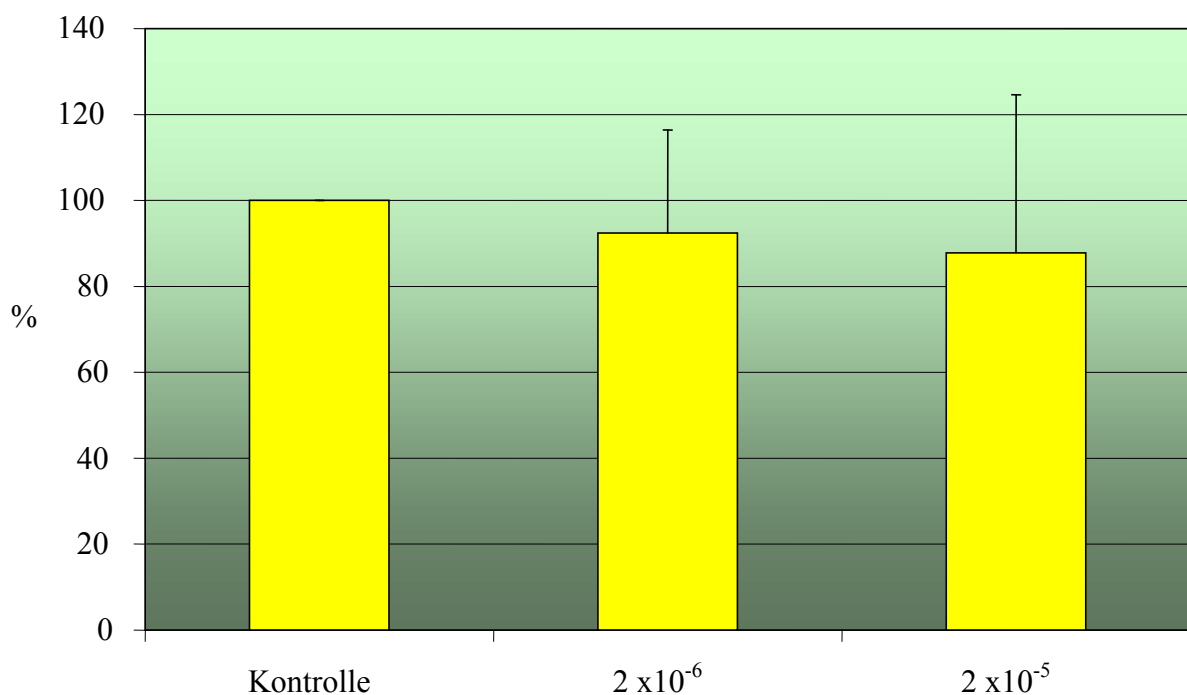


Abb. 2

Beeinflussung der Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 durch Proteinaseinhibitor 1

In Abbildung 2 ist die Veränderung der Adhärenz unter dem Einfluss von zwei Konzentrationen (2×10^{-6} und 2×10^{-5}) der Substanz 1 dargestellt. Es wurde der Ausgangswert gleich 100% gesetzt. Bei beiden Konzentrationen konnte eine Tendenz zur Verringerung der Adhärenz des Keimes festgestellt werden, wobei die höhere Konzentration einen deutlicheren Hemmeffekt zeigte. Diese Verringerungen erwiesen sich jedoch bei keiner Konzentration signifikant.

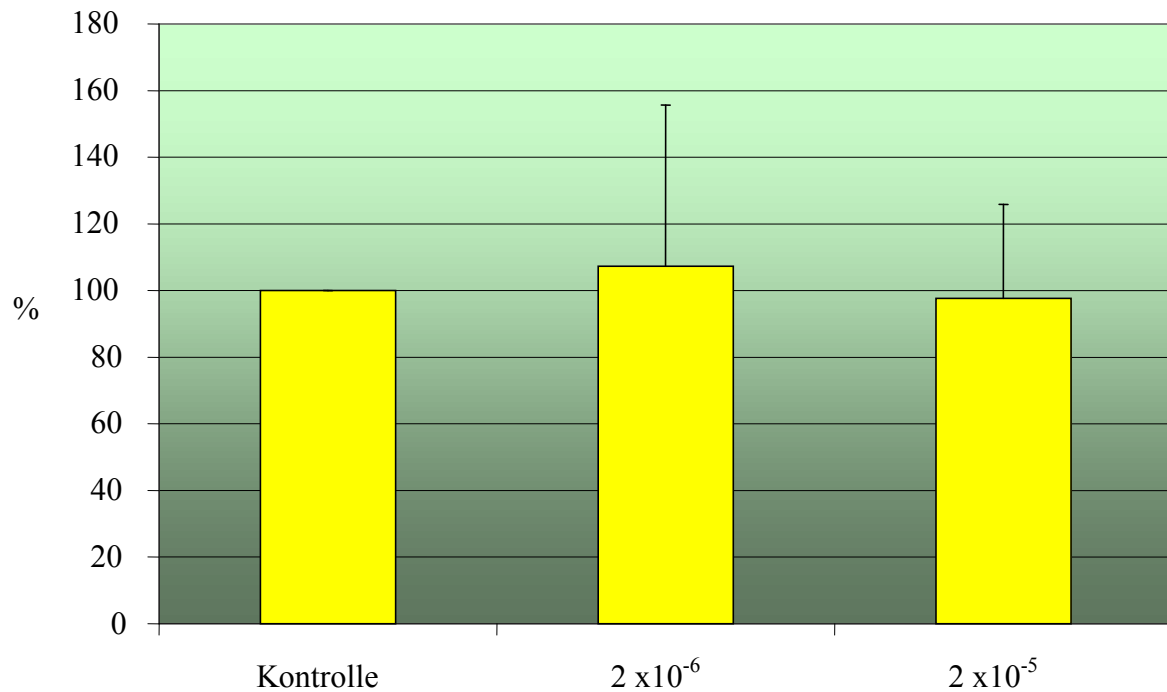


Abb. 3
Beeinflussung der Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch Proteinaseinhibitor 2

Die Abbildung 3 zeigt die Beeinflussung des Proteinaseinhibitor 2 auf die Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis*. Auch hier wurde der Ausgangswert gleich 100% gesetzt. Nach Zugabe der Substanz in der höheren Konzentration konnte ein geringer, jedoch nicht signifikanter, Hemmeffekt beobachtet werden. Mit der niedrigeren Konzentration konnte keine Hemmung erzielt werden.

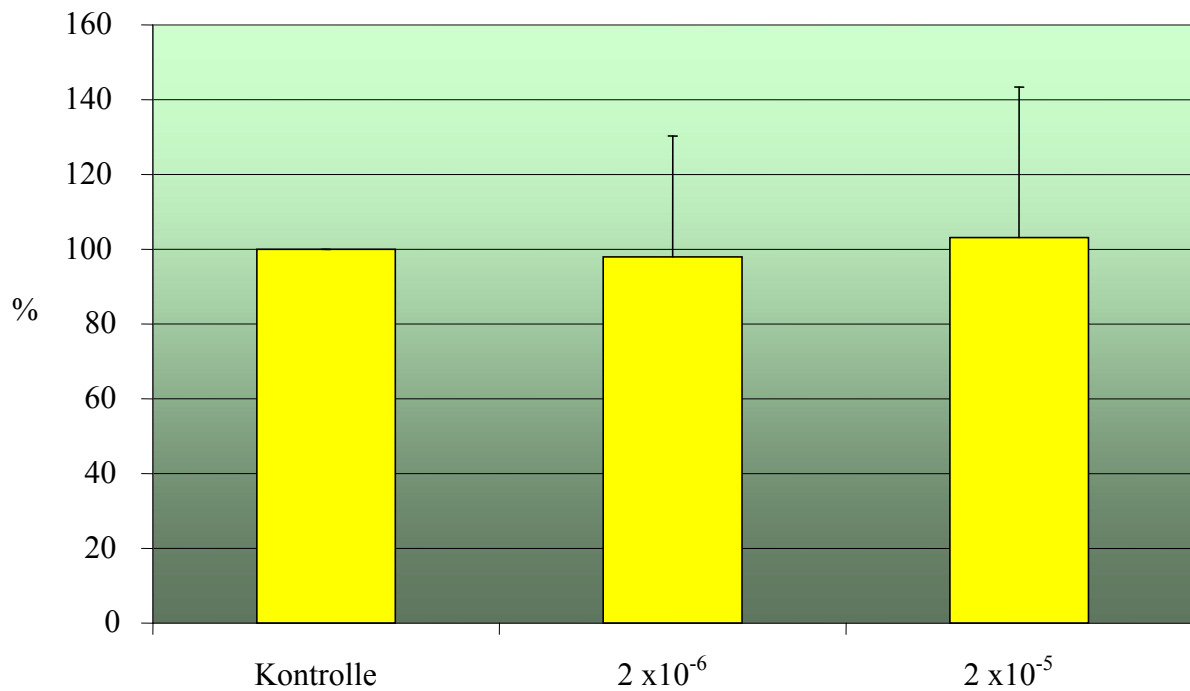


Abb. 4
Beeinflussung der Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch Proteinaseinhibitor 3

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse nach Zugabe von Proteinaseinhibitor 3 dargestellt. Der Ausgangswert wurde auf 100 % gesetzt. Die niedrigere Konzentration erzielte nur eine sehr geringe Hemmungswirkung. Dieser Unterschied konnte statistisch nicht gesichert werden. Bei der höheren Konzentration war eher eine Steigerung der Adhärenz zu beobachten.

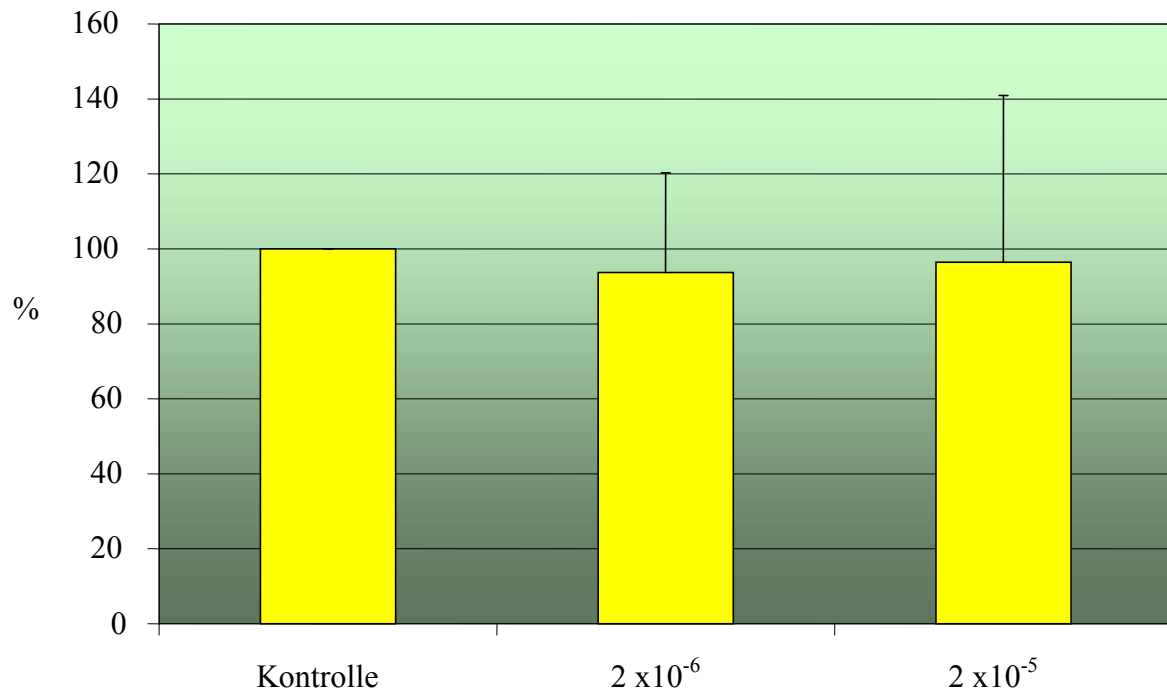


Abb. 5
Beeinflussung der Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch Proteinaseinhibitor 6

In Abbildung 5 wird der Einfluss des Proteaseinhibitor 6 auf die Adhärenz dargestellt. Auch hier wurde der Ausgangswert gleich 100% gesetzt. Es sind lediglich geringe Hemmeffekte, bei beiden Konzentrationen aber ohne Signifikanz festzustellen.

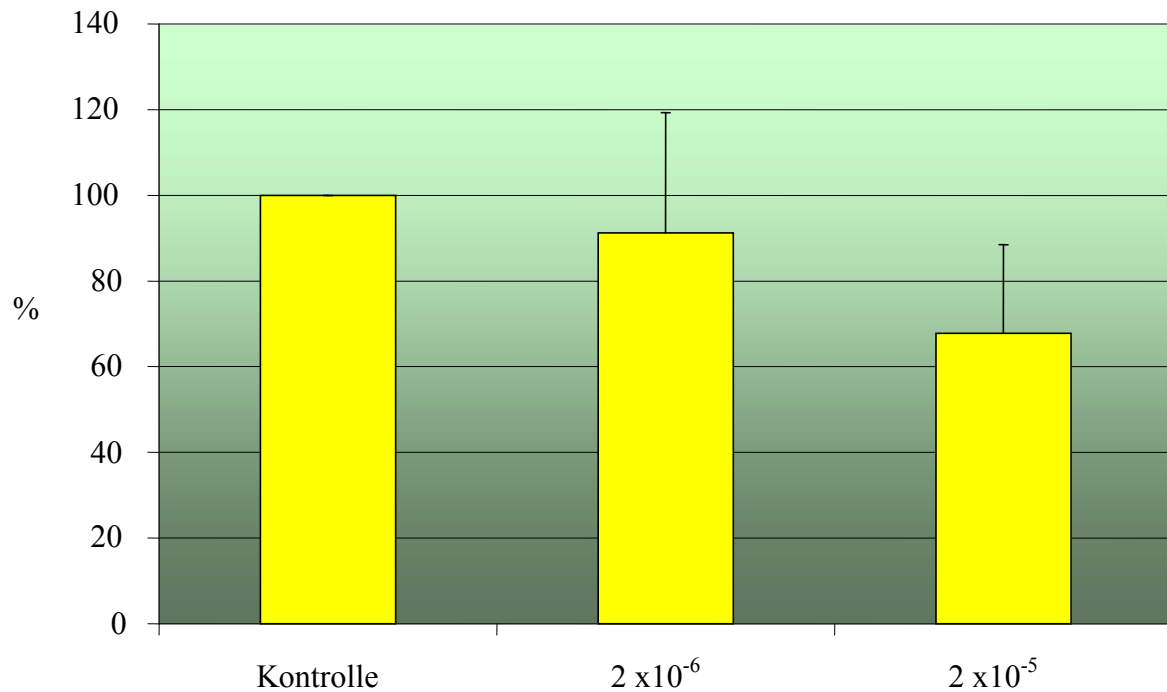


Abb. 6
Beeinflussung der Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch Proteinaseinhibitor 7

Die Abbildung 6 stellt die Veränderungen der Adhärenz unter dem Einfluss der Substanz 7 dar, wobei der Ausgangswert gleich 100% gesetzt wurde. Es zeigt sich eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung. Die Zugabe der höheren Konzentration bewirkte hierbei eine signifikante Veränderung ($p < 0,001$).

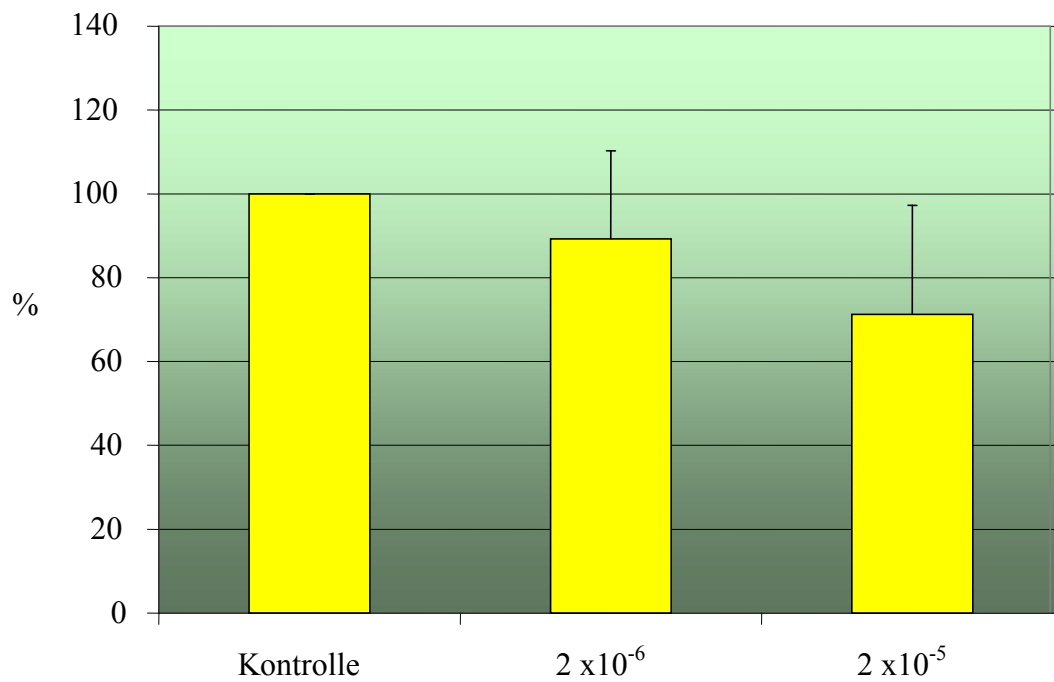


Abb. 7
Beeinflussung der Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch Proteinaseinhibitor 9

Nach Zugabe des Proteinaseinhibitor 9 liegen bei beiden Konzentrationen (2×10^{-6} $p = 0,006$; 2×10^{-5} $p = 0,001$) signifikante Reduktion der Adhärenz vor. Diese Veränderungen sind in Abbildung 7 dargestellt. Der Ausgangswert wurde gleich 100% gesetzt.

6.2. Untersuchung zur Wirkung von Proteinaseinhibitoren auf die Internalisierung von *Porphyromonas gingivalis*

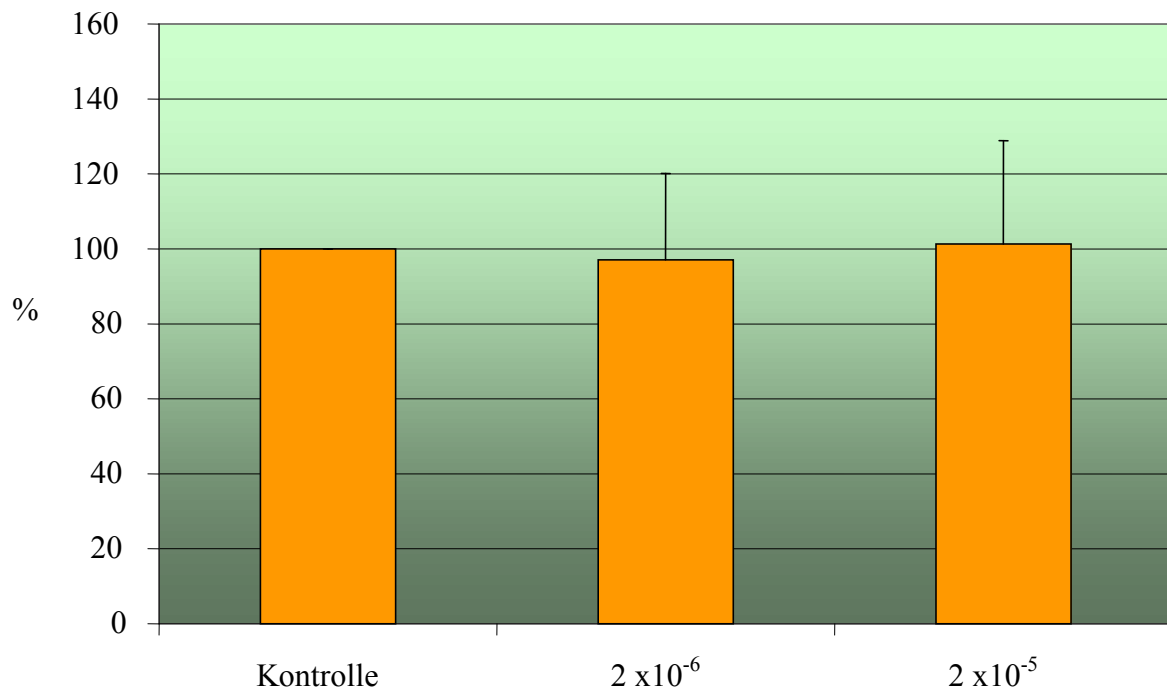


Abb. 8
Beeinflussung der Internalisierung von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch Proteinaseinhibitor 1

Nur geringfügige Veränderungen ergaben sich unter dem Einfluss von Proteinaseinhibitor 1. Bei der niedrigeren Konzentration zeigte sich eine leichte Hemmwirkung. Dieser Unterschied erwies sich allerdings nicht als signifikant. Die höhere Konzentration erzielte eher eine leichte Zunahme der Internalisierung. Auch hier wurde der Ausgangswert gleich 100% gesetzt.

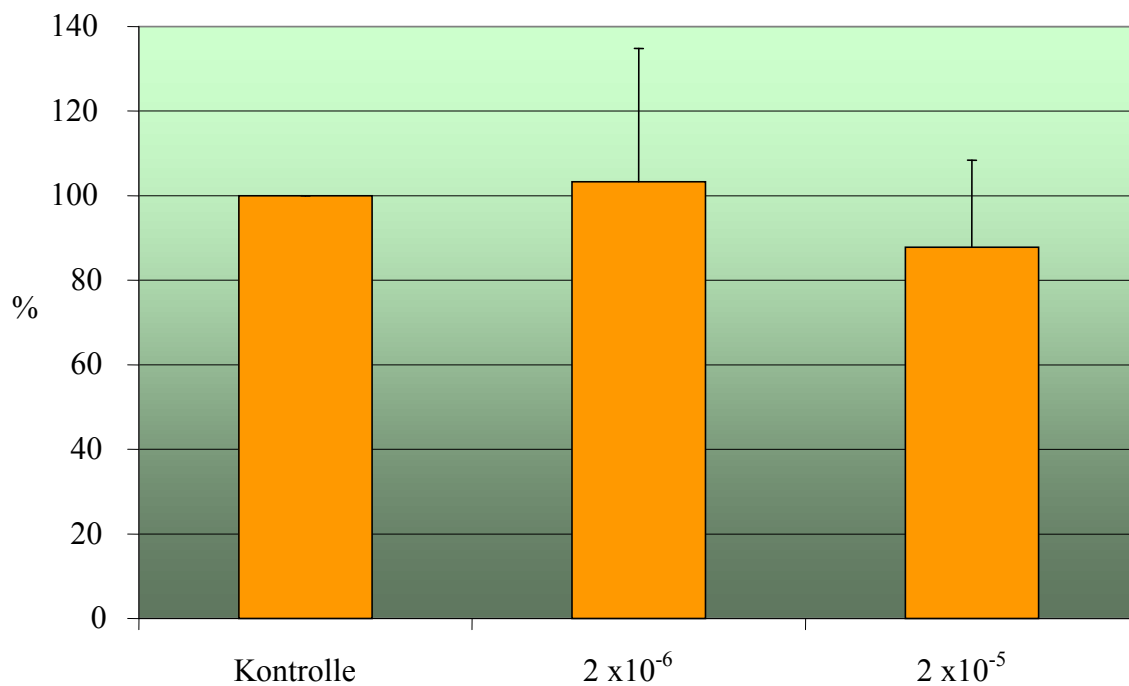


Abb. 9
Beeinflussung der Internalisierung von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch Proteinaseinhibitor 2

In Abbildung 9 ist die Veränderung der Internalisierung unter dem Einfluss von zwei Konzentrationen der Substanz 2 dargestellt. Es wurde der Ausgangswert gleich 100% gesetzt. Die niedrigere Konzentration zeigt die Tendenz zur Steigerung der Internalisierung. Bei der höheren Konzentration ist eine nicht signifikante Hemmwirkung festzustellen.

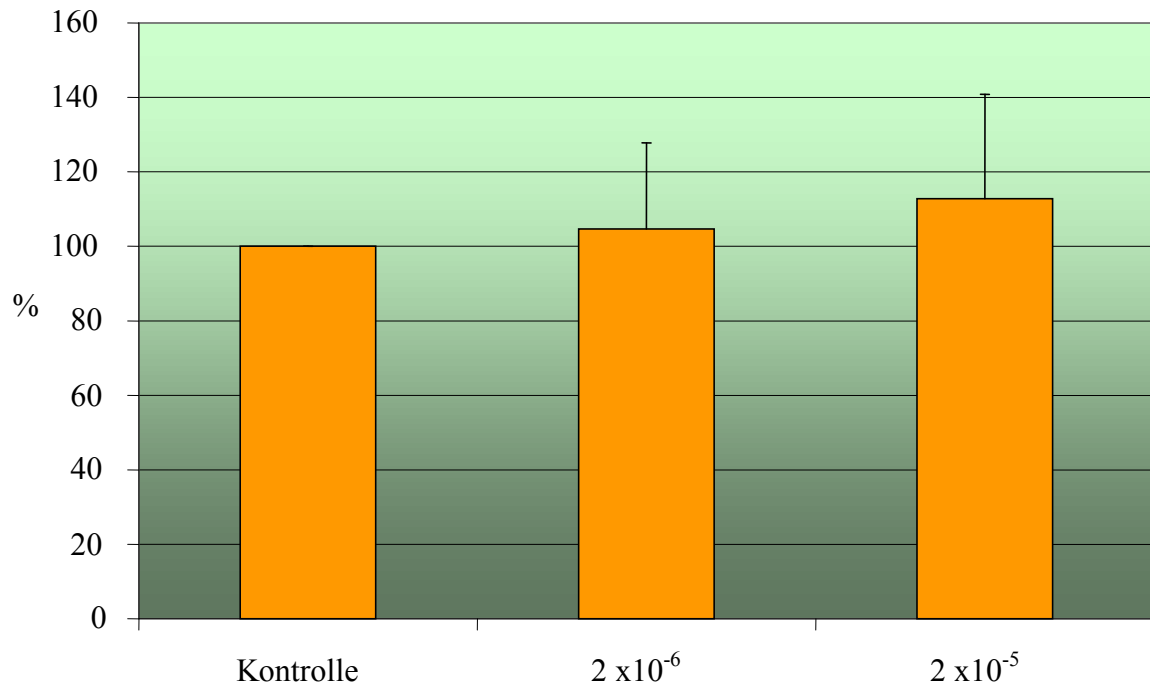


Abb. 10
Beeinflussung der Internalisierung von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch
Proteinaseinhibitor 3

Die Abbildung 10 erfasst die Effekte nach Zugabe von Proteinaseinhibitor 3. Auch hier wurde der Ausgangswert gleich 100% gesetzt. Bei beiden Konzentrationen kann man eher eine Zunahme der Internalisierung verzeichnen.

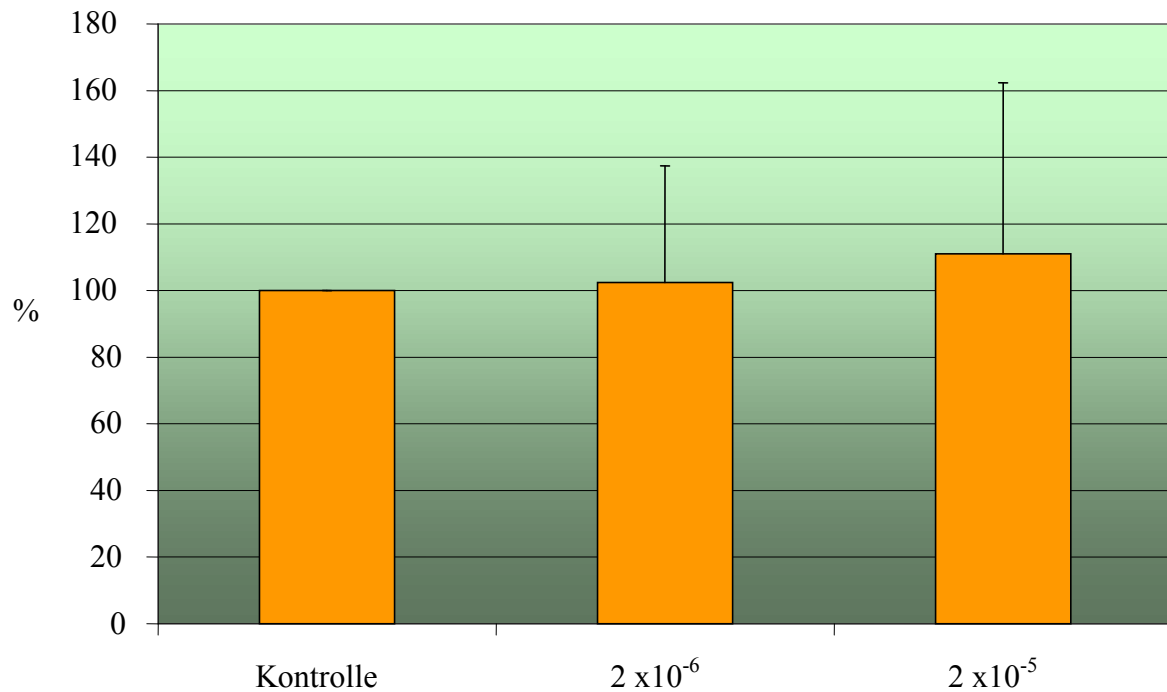


Abb. 11
Beeinflussung der Internalisierung von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch
Proteinaseinhibitor 6

Die Veränderungen der Internalisierung unter dem Einfluss des Proteinaseinhibitor 6 sind in Abbildung 11 dargestellt. Auch hier waren bei beiden Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zu erfassen. Der Ausgangswert wurde gleich 100% gesetzt.

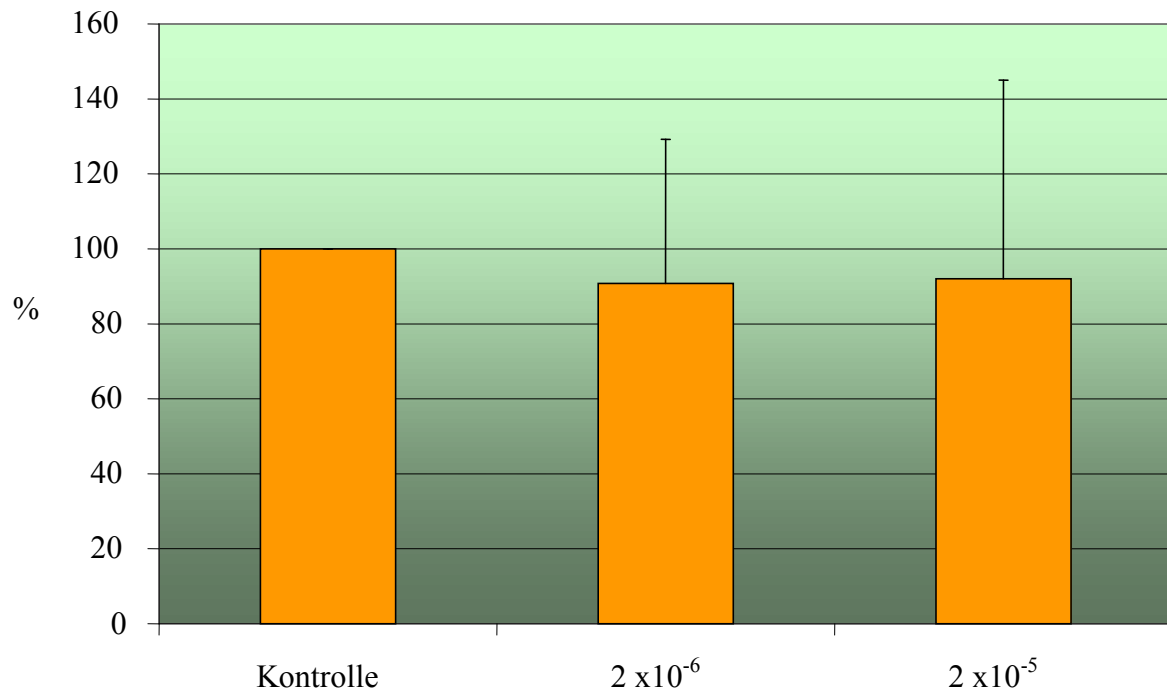


Abb. 12
Beeinflussung der Internalisierung von *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277 durch Proteinaseinhibitor 7

Eine Hemmwirkung der Internalisierung ohne Signifikanz zeigt sich auch nach Zugabe von Proteinaseinhibitor 7 bei beiden Konzentrationen. Der Ausgangswert wurde wiederum gleich 100% gesetzt.

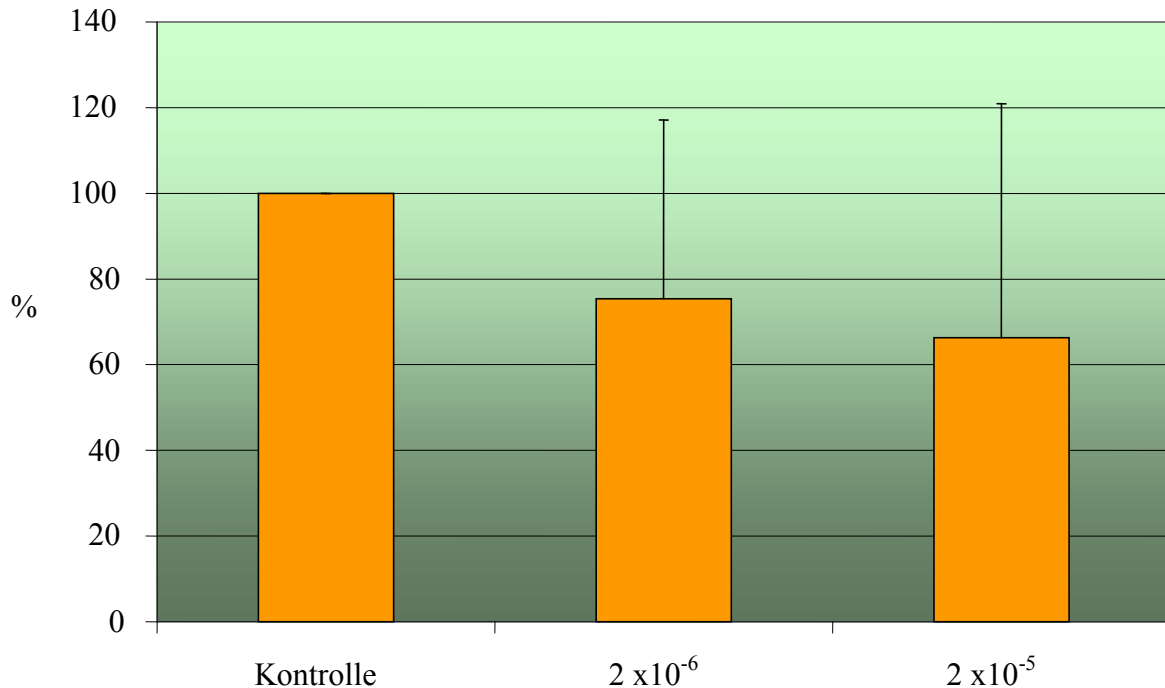


Abb. 13
Beeinflussung der Internalisierung von *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 durch Proteinaseinhibitor 9

Deutliche Veränderungen können unter dem Einfluss von Proteinaseinhibitor 9 dargestellt werden. Bei beiden Konzentrationen ist Hemmung, jedoch ohne Signifikanz festzustellen. Der Ausgangswert ist gleich 100% gesetzt wurden.

6.3 Untersuchung zur Wirkung von Proteinaseinhibitoren auf die Hämagglutination

Ohne den Zusatz von Inhibitoren konnte bei dem Stamm ATCC 33277 eine Hämagglutination bis zur Verdünnung von 1:32, bei dem Stamm JH16-1 bis 1:64 beobachtet werden. Die Doppelbestimmung zeigten bei dem jeweils zu prüfenden Stamm stets übereinstimmende Ergebnisse. Keinerlei Effekte auf die Hämagglutination wurden durch die Substanzen 3 und 7 beobachtet. Die Hämagglutination des ATCC- Stammes wurde durch die Substanzen 1,4,6 und 9 in beiden Konzentrationen gehemmt.

Die Substanz 2 hatte Effekt nur in einer Konzentration. Die Hämagglutination des JH16-1-Stammes wurde durch die Substanz 1 in beiden Konzentrationen, durch die Inhibitoren 4,6 und 9 jeweils nur in einer Konzentration vermindert (Tabelle 1).

Tabelle 1

Einfluss von Proteinaseinhibitoren auf die Hämagglutination durch *Porphyromonas gingivalis*

Inhibitor	ATCC 33277 2×10^{-6}	ATCC 33277 2×10^{-5}	JH16-1 2×10^{-6}	JH16-1 2×10^{-5}
1	±	+	±	+
2	0	±	0	0
3	0	0	0	0
4	±	±	±	0
6	+	+	0	+
7	0	0	0	0
9	+	+	0	±

0 - kein Effekt, ± - geringfügiger Effekt (Hämagglutination nur schwach 1:32 bzw. 1:64),
+ - Hemmung der Hämagglutination ab Titer 1:128

7. Diskussion

Die Parodontitis ist nicht nur ein Problem des Mundes, sondern offensichtlich des Gesamtorganismus. So wurde der Zusammenhang zwischen Herzinfarkt- und Apoplexrisiko sowie auch Frühgeburtlichkeit und der Erkrankung an Parodontitis seit mehreren Jahren in epidemiologischen Studien bestätigt. In Deutschland liegt die Häufigkeit von behandlungsbedürftigen Parodontitiden bei über 75%. Die Kolonisation mit parodontopathogenen Keimen erfolgt bereits im Kindesalter durch Kontakt mit den Bezugspersonen. Diese Bakterien sind in geringen Mengen auch im gesunden Sulcus anzutreffen. Neben *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* und oralen Spirocheten wie *Treponema denticola* nimmt vor allem das anaerobe Bakterium *Porphyromonas gingivalis* bei der Entstehung der Parodontitis eine wichtige Rolle ein. (Kuramitsu 1998; Wingrove et al. 1992; Schenkein et al. 1995)

Die Adhäsion und Invasion von Epithelzellen durch *Porphyromonas gingivalis* sind grundlegende Schritte der Pathogenese der Parodontitis (Eick et al. 2006). Eine Reihe von Arbeitsgruppen haben sich damit beschäftigt, die Aktivität von *Porphyromonas gingivalis* zu hemmen. Dabei handelte es sich größten Teils um Experimente über die Funktionsweise von extracellulären Cysteinproteinasen, der Gingipaine. Arginin- und Lysin-Gingipaine von *Porphyromonas gingivalis* sind wichtige Virulenzdeterminanten in Parodontalerkrankungen und sind deshalb die Zielscheibe für immun- und medikamentenvermittelte Strategien. Die Hemmung dieser Proteasen kann als neuer therapeutischer Ansatz angesehen werden (Labbe et al. 2001). Der Keim ist dazu befähigt, das Zell zu Zell Adhäsionsmolekül E-Cadherin zu degradieren.

Curtis et al. (2002) stellten in Kgp (Gingipain) einen wichtigen Virulenzfaktor von *Porphyromonas gingivalis* dar. Mittels eines spezifischen Kgp- Inhibitors zeigte er eine deutliche Reduktion des Wachstums im Nährmedium sowie eine fehlgeschlagene Pigmentierung auf dem Blutagar auf. Anhand von Sequenzanalysen erfolgte eine Subtypisierung des kgp-Gens: kgp-I und kgp-II, welche auf Unterschieden in der katalytischen Domäne beruhen (Beikler et al., 2003). Die verschiedenen Allele von kgp werden mit einer unterschiedlichen Virulenz dieser Spezies in Zusammenhang gebracht, da man bei Erkrankten immer einen vorherrschenden Biotyp nachgewiesen hat. Es obliegt zukünftigen Analysen zu beurteilen, ob eine Beziehung zwischen Struktur und dem Stadium

einer parodontalen Läsion und einer Assoziation zwischen den kgp Allelen und der Virulenz der Spezies existiert (Nadkarni et al. 2004).

Matsushita et al. (2006) untersuchten den Effekt eines neuen selektiven Inhibitors des aktivierten Faktor X (DX-9065a) am Wachstum und der Trypsin-Aktivität von *Porphyromonas gingivalis* und anderen periodontogenen Bakterien. Das Resultat war eine selektive Wachstumshemmung von *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia*. Die Trypsin-Aktivität wurde stark gehemmt und man konnte außerdem eine bakterizide Wirkung nachweisen.

Auch Tetracycline und seine Analoga, Doxycycline und Minocycline, wurden auf ihre Wirkung auf die enzymatische Aktivität der Gingipaine getestet. Imamura et al. (2001) wies vor allem bei Doxycyclin ein hohes Hemmungspotential nach. Einige, jedoch nicht alle Typstämme, scheinen sich dauerhaft in epithelialen Zellen halten zu können oder ihre Zellzahlen Tage nach einer Invasion sogar vermehren zu können. Einzelne Bakterien scheinen die Zelle dann auch wieder verlassen, respektive sie anschließend wiederbesiedeln zu können. Ein längeres Verweilen in einer Wirtszelle in einem nicht kultivierbaren Stadium wird diskutiert. Sogar die insuffiziente Wirkeffizienz einiger Antibiotika gegen das intrazellulär persistierende Bacterium könnte mit einer Phänotypveränderung von *Porphyromonas gingivalis* zusammenhängen (Eick und Pfister 2004; Eick et al. 2006).

Viele epidemiologische Berichte zeigen, dass es eine signifikante Relation zwischen parodontalen und systemischen Erkrankungen besteht. Am bekanntesten ist hier die Assoziation zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und der Parodontitis. Folglich würde die Entwicklung eines potenten Inhibitors der bakteriellen Cysteinproteinasen ein neues Therapieverfahren zur Behandlung periodontaler Erkrankungen und deren resultierende Systemerkrankungen bedeuten. Kadowaki und Yamamoto (2003, 2004) entwickelten einen neuen synthetischen Inhibitor spezifisch für Rgp und Kgp, basierend auf der spezifischen Spaltung des Histatins dieser Enzyme. Desweiteren erkannten sie die hemmende Wirkung von folgenden kleinen Peptiden: Carbobenzoxy-Lys-Arg-CO-Lys-N-(CH₂)₂ [KYT1] und Carbobenzoxy-Glu(NHN(CH₃)Ph)-Lys-CO-NHCH₂Ph [KYT- 36]. Beide Inhibitoren zeigten auch keinen oder nur geringen Effekt an den humanen Proteinasen, wie Trypsin oder Cathepsin B, L und H. Sie besaßen jedoch in Kombination die Möglichkeit, den Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* an den Wirtsproteinen (Kollagen I, Immunglobulinen, Fibronectin

und Fibrinogen), die bakterielle Aktivität an polymorphkernigen Leukozyten und die Steigerung der vaskulären Permeabilität zu verringern. Die Verhinderung der Adhäsion sowie das Überleben von menschlichen Fibroblasten und die Hämagglutination des Organismus wurden besonders durch den Einsatz von KYT 1 stark unterdrückt. Die essentiellen Funktionen des Erregers zum Wachstum und Überleben in der periodontalen Tasche, durch Nutzung von Aminosäuren wurde ebenfalls deutlich gehemmt (Kadowaki und Yamamoto 2003, 2004).

Tjäderhane et al. (2007) konnte die Rate der Nekroseausbreitung im Wurzelkanal durch Zugabe von Matrix-Metallo-Proteinaseinhibitoren reduzieren und somit die pulpare und periapikale Inflammation beeinflussen.

Die Untersuchung von Nagata et al. (2006) erforschte den Einfluss von Macrocarpal A, B und C (Phloroglucinole aus Eukalyptusblättern) an periodontopathogenen Bakterien. Die Hemmung der Arg- und Lys-spezifischen Proteinasen von *Porphyromonas gingivalis* wurde durch ein Spectrofluorophotometer bewertet und durch eine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese analysiert. Es zeigte sich eine deutliche Hemmung des Wachstums des Keimes und eine dosisabhängige Reduktion der Trypsin-like-Aktivität. Leupeptin gehört, v.a. in der Spätphase der Gingivitis, zu den potenten Inhibitoren von Rgp und Kgp-Proteinasen (Kitano et al. 2001).

Okamoto et al. (2004) studierte den Einfluß von Katechinen aus grünem Tee und deren Derivaten auf die Aktivität von Arg-Gingipainen (Rgp) und Lys-Gingipaine (Kgp) von *Porphyromonas gingivalis* mit dem Ergebnis v.a. der Hemmung von Rgp-Aktivität. Die Feststellung suggeriert, dass grüner Tee möglicherweise das Potential zur Reduktion des periodontalen Erkrankungen besitzt.

Krauser et al. (2003) haben eine neue Serie von effektiven Inhibitoren gefunden, sowie einen neuen Weg aufgezeigt, die Inhibitorpotenz von Gingipainen in Kombination mit Zink zu reduzieren. Dabei untersuchten sie mehrere Benzamidin-Derivate auf das Potential der Hemmung von RgpA und RgpB-Gingipaine. Wobei sich das Bisbenzamidin, eine Urea-Verbindung als am wirksamsten herausstellte. Die hemmende Wirkung wurde durch die Anwesenheit von Zink in einer geringen Konzentration noch verstärkt.

Der erheblichen proteolytischen Aktivität des Bakteriums steht die Notwendigkeit im Wirt zu überleben kritisch gegenüber, da deren Energiequelle abhängig von Peptiden und Aminosäuren ist. Gegenstand der Arbeit von Bodet et al. (2006) war es, den Effekt von nichtdialysierbarem Material (NDM), gewonnen aus Preiselbeersaft, an der proteolytischen Aktivität von *Porphyromonas gingivalis* zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass in dosisabhängiger Form, NDM die Potenz besitzt, die Proliferation von *Porphyromonas gingivalis* in den Gewebetaschen und die Proteinase-vermittelten Zerstörungsprozesse im Rahmen der Parodontitis zu reduzieren.

Eine weitere effektive Methode zur Reduktion der Gingipainaktivität sieht die Arbeitsgruppe um Cronan (2006) in der Wirkung von Chlorhexidin in Kombination mit Zn-II. Er konnte eine eindeutige Hemmung von RgpB und RgpA sowie Kgp unter Zugabe der genannten Stoffe beobachten. Auch Grenier (1996) evaluierte den Effekt des Chlorhexidins. Dabei zeigte sich nicht nur eine deutliche Reduktion der Adhärenz, sondern auch der Hämagglutination, durch die Bindung des Stoffes an die Zelloberfläche.

Bei Untersuchungen von Park und Lamont (1998) zeigte sich, dass *Porphyromonas gingivalis* über einen kontaktabhängigen Proteinsekretionsweg verfügt. Sie konnten nachweisen, dass der Kontakt von *Porphyromonas gingivalis* mit Epithelzellen dazu führte, dass *Porphyromonas gingivalis* mehrere Proteine mit molekularen Massen zwischen 35 und 95 kDa absonderte. Die infolge des Kontaktes mit den Epithelzellen abgesonderten Proteine könnten notwendig für eine Signaltransduktion sein, welche den Epithelzellen die Bakterienaufnahme ermöglicht. Allerdings wurde gleichzeitig eine Unterdrückung der Arg-Gingipain- und der Lys-Gingipain-Proteasen beobachtet. Diese Proteasen sind offensichtlich Antagonisten des kontakt-abhängigen Proteinsekretionsweges. Es besteht die Möglichkeit, dass die von uns verwendeten Proteinaseinhibitoren in diesen kontaktabhängigen Sekretionsweg eingreifen.

Es ist vorstellbar, dass die zusätzliche Hemmung der argininspezifischen Proteasen, die ohnehin bei Kontakt mit Epithelzellen induziert wird, zu einer vermehrten Invasion der Bakterien in die Zellen führen. *Porphyromonas gingivalis* ist in der Lage, in Epithelzellen einzudringen, dort zu überleben und sich zu vermehren (Houalet-Jeanne et al. 2001; Madianos et al. 1996).

Bei einer großen Anzahl von Arbeiten galt es das Überleben des Erregers in den Taschen des Periodonts zu untersuchen. Unsere Versuche sollten sich in diese Testreihen einordnen. Deshalb war es das Ziel, Versuchsreihen zur Beeinflussung der Adhäsion und der Invasion an und in die Gingivalzellen aufzustellen. Die von uns genutzten synthetischen Inhibitoren vom Benzamidin-Typ besitzen hemmende Effekte an den Arginin-spezifischen Cysteinproteinasen von *Porphyromonas gingivalis*. Wir testeten Pentamidine, Benzamidine und drei Bis-Benzamidin-Derivate mit einer Pentamidin-ähnlichen Struktur in zwei Konzentrationen (2×10^{-6} und 2×10^{-5}). Es war eine inhibierende Wirkung der Benzamidinderivate auf das Anheften und Eindringen von *Porphyromonas gingivalis* an die Epithelzellen erwartet worden. Eine signifikante Hemmung der Adhärenz konnte in beiden Konzentrationen nur bei Inhibitor IX, dem Pentamidin nachgewiesen werden. Der Inhibitor VII, ein einfaches Benzamidinderivat zeigte nur in der höheren Konzentration eine signifikante Hemmung der Adhärenz. Alle weiteren getesteten Inhibitoren wiesen eine hemmende Wirkung nach, die jedoch keine Signifikanz erreichten. Die Internalisierung blieb in beiden Konzentrationen bei allen getesteten Inhibitoren ohne signifikante Veränderungen.

Es gibt noch keine spezifischen Medikamente gegen *Porphyromonas gingivalis* oder seine Virulenzfaktoren (Matsushita et al. 2006).

Antibiotika sind, neben der professionellen Zahnreinigung mit Scaling und Wurzelglättung und auch chirurgisch-korrektiven Therapie, als unterstützende Maßnahme weit verbreitet. Ein Problem stellt jedoch die zunehmende Resistenzentwicklung dar (Walker 1996; Slots and Greenwell 2004). Bei Untersuchungen von Chung et al. 2002 hatten 66% der untersuchten Patienten Antibiotika-resistente Keimisolate.

Weitere Nachteile der adjuvanten systemischen Gabe von Antibiotika zeichnen sich durch ein erhöhtes Risiko des Auftretens von Nebenwirkungen (Slots and Greenwells 2004), die unzureichenden Konzentrationen des Medikamentes in der Sulkusflüssigkeit (Goodson 1994) und die unsichere Compliance des Patienten (Loesche et al. 1993).

Es wird stets nach neuen Mitteln und Methoden gesucht, die Parodontitistherapie zu optimieren. Einen Ansatz stellen die Proteinaseinhibitoren dar.

Diese könnten praktisch relevant werden, da die physiologische Funktion von Proteasen eine wesentliche Rolle in der Strategie des Bakteriums spielt, sich der Wirtabwehr zu entziehen

(Curtis et al. 2002). In diesem Fall könnte die Hemmung der Proteasefunktion des Erregers, diesen wieder empfindlicher gegenüber der eigenen Wirtsabwehr machen.

Die Tatsache, dass Gingipaine von *Porphyromonas gingivalis* stark mit der Pathophysiologie der parodontologischen Erkrankungen in Verbindung zu bringen sind, und letzt endlich für die typische Symptomatik der Erkrankung mit Gewebszerstörung verantwortlich ist, stellt möglicherweise für den Inhibitor IX, dem Pentamidin, einen Ansatz für eine neue Behandlungsmöglichkeit dar. Pentamidin wird in der Humanmedizin bereits als Antiprotozoikum verwendet und kommt bei Infektionen mit bestimmten Sprosspilzen (*Pneumocystis carinii*) zur Anwendung. Der Wirkmechanismus des Pentamidins besteht aus dem Eingriff in die Folsäuremetabolisierung, der Störung der DNA-, RNA- und der Proteinsynthese. Beikler et al. (2005) zeigte in seinen Untersuchungen, dass sich innerhalb der natürlichen *Porphyromonas gingivalis* Population fünf *rgpB*-Genotypen finden lassen, was hinsichtlich der zukünftigen Entwicklung spezifischer Inhibitoren von Bedeutung sein könnte.

Eine noch sehr junge Untersuchung beschäftigte sich mit der Genexpression von RANKL (Receptor Activator of NF- κ B ligand) und von OPG (Osteoprotegerin) in PDL (human periodontal ligament) Zellen und in Gingivalfibroblasten in Reaktion auf *Porphyromonas gingivalis* W50. RANKL kann die Knochenresorption stimulieren, OPG wirkt dem antagonistisch entgegen. Der Wildtyp verursachte im Ergebnis eine Zunahme des Expressionsverhältnisses RANKL/OPG bei den PDL Zellen, wie auch bei den Gingivalfibroblasten. Eine Lys-Gingipain defizitäres Derivat des Wildtypes hatte keinen Einfluss. Dagegen provozierte eine Arg-Gingipain defizitäre Mutation einen weiteren Anstieg der RANKL mRNA Expression, beide verglichen mit dem elterlichen Typstamm (Belibasakis et al. 2007, Okahashi et al. 2004). Es liegen zwar noch weitere Untersuchungen vor, die einen Zusammenhang zwischen *Porphyromonas gingivalis* und einem mit den RANKL/OPG Interaktionen verbundenen Knochenverlust bei Patienten mit Parodontitis herstellen können, weitere Evidenz für den expliziten Einfluss von Gingipainen gibt es jedoch zur Zeit noch nicht (Gemmell et al. 2007).

Hämagglutinine sind wichtige Adhäsionsmoleküle, welche *Porphyromonas gingivalis* das Adhären an Gingivalgewebe und an Erythrozyten sowie deren Lyse mit Hilfe von Eisenionen erlauben.

Tezuka et al. (2006) konnte im Rahmen eines Screenings nach Hämagglutinationsaktivitäten ein Hämagglutinin, das sogenannte Hämagglutinin A (Hag A) klonen.

Es erfolgten Wachstumsuntersuchungen unter Hämrestrictio sowie nach erhöhter Zufuhr. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der extracellulären Vesikel und ein höherer Hämagglutinationstiter unter der Hämrestriction (Smalley et al. 1991).

Die Gruppe um Shibata (2005) konnte einen Antikörper (Xeno-mAbs, IgG2-Subklasse) konstruieren, welcher zur passiven Immunisierung gegen die beschriebene Erkrankung eingesetzt werden könnte.

Die Temperatur ist ein Umweltfaktor, der die Genexpression modulieren kann. Die Persistenz der Bakterien in den Zahnfleischtaschen ist abhängig von der Temperatur während der Infektion. Die Studie von Percival et al. (1999) untersuchte den Einfluss der Temperatur von 37, 39 und 41°C auf die Expression von Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis*. Bei diesen Temperaturen konnte ein gutes Wachstum beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Reduktion der Expression von arginin-spezifischen und lysin-spezifischen Aktivitäten mit steigenden Temperaturen.

Auch die Wirkung von Pflanzen auf den Erreger ist untersucht worden. Lee et al. (2004) fanden heraus, dass ein Säurebestandteil der Wurzel des *Panax Ginseng* inhibitorische Fähigkeiten besitzt.

Proteinaseinhibitoren könnten allgemein als eine neue Klasse antimikrobieller Substanzen auch in der Bekämpfung anderer Keime mit Proteasen Bedeutung besitzen (Curtis et al. 2002).

8. Schlussfolgerungen

Die adjuvante Antibiotikatherapie ist eine etablierte Maßnahme der Therapie bei schweren chronischen und aggressiven Parodontitiden. Unter dem Eindruck zunehmender Resistenzentwicklung pathogener und fakultativ pathogener Bakterien gegenüber Antibiotika ist die Suche nach alternativen Therapiemöglichkeiten gerechtfertigt und von großem Interesse.

Die meisten Formen der Parodontitis sind bakteriell bedingte Erkrankungen des Zahnhalteapparates, wobei die anaerobe Spezies *Porphyromonas gingivalis* als einer der bakteriellen Hauptverursacher für diese Erkrankung angesehen wird. Es ist bekannt, dass Arginin- und Lysin-spezifische Proteinasen, die auch als Gingipaine bezeichnet werden, zu den wichtigsten Virulenzfaktoren dieses Mikroorganismus gehören. Daher erscheint die Möglichkeit, eine Beeinflussung bzw. Minderung der Virulenz von *Porphyromonas gingivalis* über eine Hemmung dieser bakteriellen Proteasen zu erreichen, ein viel versprechender Weg zu sein.

In der als Pilotstudie anzusehenden vorliegenden eigenen Untersuchung erwiesen sich die getesteten Inhibitoren als unterschiedlich wirksam gegenüber den Prozessen der Adhärenz und Internalisierung von *Porphyromonas gingivalis* in epitheliale Zellen. Von den eingesetzten Benzamidin-, Bis-Benzamidinderivaten sowie Pentamidin erwies sich das Pentamidin als die wirkungsvollste Substanz zur Hemmung der Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* an KB-Zellen. Alle getesteten Inhibitoren erwiesen sich demgegenüber als wirkungslos zur Beeinflussung des Internalisierungsvermögens der geprüften Bakterien-Spezies.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass weitere Untersuchungen zur Beeinflussung des Adhäsions- und Internalisierungsvermögens von *Porphyromonas gingivalis* mit Derivaten des Pentamidins durchgeführt werden sollten, um einen besseren Überblick über diesen zumindest theoretisch sehr interessanten alternativen Therapieansatz zu bekommen.

9. Literaturverzeichnis

1. Abe, N., Kadowaki, T., Okamoto, K., Nakayama, K., Ohishi, M., Yamamoto, K.: Biochemical and functional properties of lys-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *J Biochem* 1998: 123; 305-312
2. Andrian, E., Grenier, D., Rouabhia, M.: *Porphyromonas gingivalis* gingipains mediate the shedding of syndecan-1 from the surface of gingival epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2006: 21; 123-128
3. Armitage, G.C.: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999: 4; 1-6
4. Bach, M.K.: Mediators of anaphylaxis and inflammations. *Annu Ev Microbiol* 1982: 36; 371-413
5. Baehni, P., Tsai, C.C., McArthur, W.P., Hammond, B.F., Taichman, N.S.: Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun* 1979: 24; 233-243
6. Banbula, A., Potempa, J., Travis, J., Bode, W., Medrano, F.-J.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of gingipain R2 from *Porphyromonas gingivalis* in complex with H-D-Phe-Phe-Arg-chloromethylketone. *Protein Science* 1998: 7; 1259-1261
7. Bedi, G.S.: Purification and characterization of lysine- and arginine-specific gingivain proteases from *Porphyromonas gingivalis*. *Preparative Biochemistry* 1994: 24; 251-261
8. Bedi, G.S.: Comparative study of four proteases from spent culture media of *Porphyromonas gingivalis*. *Prep Biochem* 1995: 25; 133-154
9. Belibasakis, G.N., Bostanci, N., Hashim, A., Johansson, A., Aduse-Opoku, J., Curtis, M.A., Hughes, F.J.: Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of arg-gingipains. *Microbial Pathogenesis* 2007: 43; 46-53
10. Beikler, T., Peters, U., Ehmke, B., Flemmig, T.F.: Sequence analysis of kgp in *Porphyromonas gingivalis* isolates from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2003: 18; 393-397
11. Beikler, T., Peters, U., Prior, K., Ehmke, B., Flemmig, T.F.: Sequence variations in *rgpA* and *rgpB* of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *J Periodont Res* 2005: 40; 193-198
12. Bodet, C., Piché, M., Chandad, F., Grenier, D.: Inhibition of periodontopathogen-derived proteolytic enzymes by a high-molecular-weight fraction isolated from cranberry. *J Antimicrob Chemother* 2006: 57; 685-690

13. Brown, J.L., Loe, H.: Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Ann Periodontol* 1993: 2; 57-71
14. Chung, W.O., Gabany, J., Persson, G.R., Roberts, M.C.: Distribution of erm(F) and tet(Q) genes in 4 oral bacterial species and genotypic variation between resistant and susceptible isolates. *J Clin Periodontol* 2002: 29; 52-8
15. Cohen, G.N., Holzer, H.: Limited proteolysis in microorganisms. Washington, US Department of Health, Education and Welfare (1979)
16. Cronan, C.A., Potempa, J., Travis, J., Mayo, J.A.: Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* proteinases (gingipains) by chlorhexidine: synergistic effect of Zn(II). *Oral Microbiol Immunol* 2006: 21; 212-217
17. Curtis, M.A., Aduse-Opoku, J., Rangarajan, M.: Cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis*. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001: 12; 192-216
18. Curtis, M.A., Aduse Opoku, J., Rangarajan, M., Gallagher, A., Sterne, J.A., Reid, C.R., Evans, H.E., Samuelsson, B.: Attenuation of the virulence of *Porphyromonas gingivalis* by using a specific synthetic Kgp protease inhibitor. *Infect Immun* 2002: 70; 6968-6975
19. Cutler C.W., Kalmar J.R., Genco C.A.: Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in Microbiology* 1995: 3; 45-51
20. De Carlo, A.A., Harber, G.J.: Hemagglutinin activity and heterogeneity of related *Porphyromonas gingivalis* proteinases. *Oral Microbiol Immunol* 1997: 12; 44-56
21. Docherty, K., Steiner, D.F.: Post-translational proteolysis in polypeptid hormon biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 1982: 44; 625-38
22. Doolittle, R.F.: Fibrinogen and fibrin. *Ann Rev Biochem* 1984: 53; 195-229
23. Eick, S., Pfister, W., Sigusch, B., Straube, E.: Phagocytosis of periodontopathogenic bacteria by crevicular granulocytes is depressed in progressive periodontitis. *Infection* 2000: 28; 301-304
24. Eick, S., Pfister, W.: Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *J Periodontol* 2004: 75; 1327-1334
25. Eick, S., Reißmann, A., Rödel, J., Schmidt, K-H., Pfister, W.: *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol* 2006: 21; 231-237
26. Ellen, R.P., Lepine, G., Nghiem, P.-M.: In vitro models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria. *Adv Dent Res* 1997: 11; 33-42
27. Enzyme Nomenclature: Recommendation of the International Union of Biochemistry, New York, Academic Press 1978

28. Frisch, S.M., Fancis, H.: Disruption of epithel cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994: 124; 619-626
29. Gemmell, E., Yamazaki, K., Seymour, G.J.: The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology* 2007: 43; 14-40
30. Genco R.J., Slots J.: Host responses in periodontal diseases. *J Dent Res* 1984: 63; 441-451
31. Genco, R.J., Kornman, K., Williams, R., Offenbacher, S., Zambon, J.J., Ishikawa, I., Listgarten, M., Michalowicz, B., Page, R., Schenkein, H., Slots, J., Socransky, S.: Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontology* 1996: 1; 926-932
32. Goodson, J.M.: Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol (2000)* 1994: 5; 142-168
33. Goldberg, A.L., St. John A.C.: Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Ann Rev Biochem* 1976: 45; 747-803
34. Gordon, A.H., Koj, A.: Acute-phase response to injury and infection: The Roles of Interleukin-1 and other mediators. Amsterdam, Elsevier Science (1985)
35. Gottesman, S., Gottesman, M., Shaw, J.E., Pearson, M.L.: Protein degradation in *E.coli*: the lon mutation and bacteriophage lambda N and cII protein stability. *Cell* 1981: 24; 225-233
36. Grenier, D.: Effect of chlorhexidine on the adherence properties of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 1996: 23; 140-142
37. Hart T.C., Shapira A., Van Dyke T.E.: Neutrophil defects as risk faktors for peridontal diseases. *J Peridontol* 1994: 65; 521-529
38. Hershko, A., Ciechanover, A.: Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Ann Rev Biochem* 1982: 51; 335-364
39. Hinode, D., Nagata, A., Ichimiya, S., Hayashi, H., Morioka, M., Nakamura, R.: Generation of plasma kinin by three types of protease isolated from *Porphyromonas gingivalis* 381. *Archs Oral Biol* 1992: 37; 859-861
40. Hinode, D., Masuda, K., Yoshioka, M., Hayashi, H., Nakamura, R., Grenier, D., Mayrand, D.: Biological and antigenic characterization of three BApNA-hydrolyzing proteases from the culture supernatanant of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 1996: 11; 8-14
41. Hirsch, R.L.: The complement system: its importance in the host response to viral infections. *Microbiol Rev* 1982: 46; 71-85
42. Holzer, H., Tschesche, H.: Biological Functions of Proteinases, Berlin, Springer-Verlag (1979)

43. Holzer, H., Heinrich, P.C.: Control of proteolysis. *Ann Rev Biochem* 1980: 49; 63-91
44. Houalet-Jeanne, S., Pellen-Mussi, P., Tricot-Doleux, S., Apiou, J., Bonnaure-Mallet, M.: Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy. *Infect Immun* 2001: 69; 7146-7151
45. Imamura, T., Potempa J., Pike R.N., Travis J.: Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1995: 63; 1999-2003
46. Imamura, T., Matsushita, K., Travis, J., Potempa, J.: Inhibition of trypsin-like cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* by tetracycline and its analogues. *Antimicrob Agents Chemother* 2001: 45; 2871-2876
47. Imamura, T.: The Role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontology* 2003: 74; 111-118
48. Jackson, C.M., Nemerson, C.M., Nemerson, Y.: Blood coagulation. *Ann Rev Biochem* 1980: 49; 765-811
49. Jagels, M.A., Ember, J.A., Travis, J., Potempa, J., Pike, R., Hugli, T.E.: Cleavage of the human C5A receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Adv Exp Med Biol* 1996: 389; 155-164
50. Jeffcoat, M.K., Mc Guire, M., Newman, M.G.: Evidence based periodontal treatment. *J Armer Dent Assoc* 1997: 128; 713-724
51. Kadowaki, T., Yamamoto, K.: Suppression of virulence of *Porphyromonas gingivalis* by potent inhibitors specific for gingipains. *Curr Protein Pept Sci* 2003: 4; 451-458
52. Kadowaki, T., Baba, A., Abe, N., Takii, R., Hashimoto, M., Tsukuba, T., Okazaki, S., Suda, Y., Asao, T., Yamamoto, K.: Suppression of pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* by newly developed gingipain inhibitors. *Mol Pharmacol* 2004: 66; 599-606
53. Kaminishi, H., Cho, T., Itoh, T., Iwata, A., Kawasaki, K., Haginara, Y., Maeda, H.: Vascular permeability enhancing activity of *Porphyromonas gingivalis* protease in guinea pigs. *FEMS Microbiol Lett* 1993: 15; 109-114
54. Katunuma, N., Umezawa, H., Holzer, H.: Proteinase inhibitors: Medical and biological aspects. Japan Scientific Societies Press and Springer-Verlag, Tokyo (1983)
55. Ketterl, W.: Parodontologie. Urban & Schwarzenberg Verlag, München (1990)
56. Kitano, S., Irimura, K., Sasaki, T., Abe, N., Baba, A., Miyake, Y., Katunuma, N., Yamamoto, K.: Suppression of gingival inflammation induced by *Porphyromonas gingivalis* in rats by leupeptin. *Jpn J Pharmacol* 2001: 85; 84-91
57. Kornman, K.S., Holt, S.C., Ebersole, J., Felton, J.; Brunsvold, M.: Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* 1988: 239; 55-57

58. Krauser, J.A., Potempa, J., Travis, J., Powers, J.C.: Inhibition of arginine gingipains (RgpB and HRgpA) with benzamidine inhibitors: zinc increases inhibitory potency. *Biol Chem* 2002; 383; 1193-1198
59. Kubinowa, M., Amano, A., Shizukuishi, S.: Hemoglobin-binding protein purified from *Porphyromonas gingivalis* is identical to lysine-specific cysteine proteinase (Lys-Gingipain). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249; 38-43
60. Kuboniwa, M., Amano, A., Shizukuishi, S., Nakagawa, I., Hamada, S.: Specific antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Lys-gingipains by DNA vaccination inhibit bacterial binding to hemoglobin and protect mice from infection. *Infect Immun* 2001; 69; 2972-2979
61. Kuramitsu, H.K., Yoneda, M., Madden, T.: Proteases and collagenases of *Porphyromonas gingivalis*. *Adv Dent Res* 1995; 9; 37-40
62. Kuramitsu, H.K.: Proteases of *Porphyromonas gingivalis*: what don't they do? *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13; 263-270
63. Labbé, S., Grenier, D., Plamondon, P., Uitto, V.J., Mayrand, D.J.: Effects of dipeptide bestatin on *Porphyromonas gingivalis* and epithelial cells. *Periodontol* 2001; 72; 714-721
64. Lamont, R.J. and Jenkinson H.F.: Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62; 1244-1263
65. Lamont, R.J., Yilmaz, O.: In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol* 2002; 30; 61-69
66. Landi, L., Amar, S., Polins, A.S., van Dyke, T.E.: Host mechanisms in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* 1997; 4; 3-10
67. Lange, D.E., Schwöppe, G.: Epidemiologische Untersuchungen an Rekruten der Bundeswehr. *Dtsch Zahnärztl Z* 1981; 36; 432-434
68. Law B.A.: Transport and utilization of proteins by bacteria. *Microorganism and Nitrogen Sources*. London, J. Wiley & Sons (1980), 381-409
69. Lee, J.Y., Sojar, H., Sharma, A., Bedi, G.S. and Genco, R.J.: Active domains of fimbriin are involved in adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* 1993; 28; 470-472
70. Lee, J.H., Lee, J.S., Chung, M.S., Kim, K.H.: In vitro anti-adhesive activity of an acidic polysaccharide from *Panax ginseng* on *Porphyromonas gingivalis* binding to erythrocytes. *Planta Med* 2004; 70; 566-568
71. Lindhe, J.: Textbook of Clinical Periodontology, Munksgaard, Copenhagen (1983)
72. Loesche, W.J., Grossman, N., Giordano, J.: Metronidazole in periodontitis (IV). The effect of patient compliance on treatment parameters. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 96-104

73. Madianos, P.N., Papapanou, P.N., Nannmark, U., Dahlén, G., Sandros J.: *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 1996: 64; 660-664
74. Marsh, P., Martin, M.V.: *Orale Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart: 2003: 1. Auflage S. 33,49
75. Matsushita, K., Imamura, T., Tanchaoen, S., Tatsuyama, S., Tomikawa, M., Travis, J., Potempa, J., Torii, M., Maruyama, I.: Selective inhibition of *Porphyromonas gingivalis* growth by a factor Xa inhibitor. *J Periodontal Res* 2006: 41; 171-176
76. Maurizi, M.R., Switzer, R.L.: Proteolysis in bacterial sporulation. *Curr Top Cell Regul* 1980: 16; 163-224
77. Merte, K.: *Parodontologie für die Praxis*. Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig-Berlin-Heidelberg (1992)
78. Micheelis, W., Schiffner, U. 2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005. Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ). IDZ-Materialienband 31.
79. Michel, J.B.: Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc Biol* 2003: 23; 2146-2154
80. Mikolajczyk-Pawlinska, J., Travis, J., Potempa, J.: Modulation of the interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Letters* 1996: 440; 282-286
81. Mikolajczyk-Pawlinska, J., Kordula, T., Pavloff, N., Pemberton, P.A., Chen, W.C., Travis, J., Potempa, J.: Genetic variation of *Porphyromonas gingivalis* genes encoding gingipains, cysteine proteinases with arginine or lysine specificity. *Biol Chem* 1998: 379; 205-211
82. Mizuno, K., Matsuo, H.: A novel protease from yeast with specificity towards paired basic residues. *Nature* 1984: 309; 558-560
83. Moore, W.E.C., Holdemann, L.V., Smibert, R.M., Hash, D.E., Burmeister, J.A., Ranney, R.R.: Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* 1982: 38; 1137-1148
84. Nadkarni, M., Ngyen, K.-A., Chapple, C.C., DeCarlo, A.A., Jacques, N.A., Hunter, N.: Distribution of *Porphyromonas gingivalis* biotypes defined by alleles of the *kgp* (Lys-Gingipain) gene. *J. Clin. Microbiol.* 2004: 42; 3873-3876
85. Nagata, H., Inagaki, Y., Yamamoto, Y., Maeda, K., Kataoka, K., Osawa, K., Shizukuishi, S.: Inhibitory effects of macrocyclic peptides on the biological activity of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontopathogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2006: 21; 159-163

86. Naito, Y., Gibbons, R.J.: Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. *J Dent Res* 1996; 75; 866-870
87. Nakayama K., Kadowaki T., Okamoto K., Yamamoto K.: Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant of Arg-gingipain to virulence. *J Biol Chem* 1995; 270; 23619-23626
88. Nakayama, K., Yoshimura F., Kadowaki T., Yamamoto K.: Involment of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 1996; 178; 2818-2824
89. Nakayama, K.: Domain-specific rearrangement between the two Arg-gingipain-encoding genes in *Porphyromonas gingivalis*: possible involvement of nonreciprocal combination. *Microbiol Immunol* 1997; 41; 185-196
90. North, M.J.: Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiol Rev* 1982; 46; 308-340
91. Oido-Mori, M., Rezzonico, R., Wang, P.L., Kowashi, Y., Dayer, J.M., Baehn, P.C., Chizzolini, C.: *Porphyromonas gingivalis* gingipain-R enhances interleukin-8 but decreases gamma interferon-inducible protein 10 production by human gingival fibroblasts in response to T-cell contact. *Infect Immun* 2001; 69; 4493-4501
92. Okahashi, N., Inaba, H., Nakagawa, I., Yamamura, T., Kuboniwa, M., Nakayama, K., Hamada, S., Amano, A.: *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of MF-kB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect Immun* 2004; 72; 1706-1714
93. Okamoto, M., Sugimoto, A., Leung, K.P., Nakayama, K., Kamaguchi, A., Maeda, N.: Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19; 118-120
94. Olsen, I., Shah, H.N., Gharbia, S.E.: Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol (2000)* 1999; 20; 14-52
95. Page, R.C.: Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontal Res* 1999; 34; 331-339
96. Park, Y., Lamont, R.J.: Contact-dependent protein secretion in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1998; 66; 4777-4782
97. Pathirana, R.D., O'Brien-Simpson, N.M., Brammer, G.C., Slakeski, N., Reynolds, E.C.: Kgp and RgpB, but not RgpA are important for *Porphyromonas gingivalis* virulence in the murine periodontitis model. *Infect Immun* 2007; 75; 1436-1442
98. Pavloff, N., Potempa, J., Pike, R.N., Prochazka, V., Kiefer, M.C., Travis, J., Barr, P.J.: Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biolog Chem* 1995; 270; 1007-1010

99. Pavloff, N., Pemperton, P.A., Potempa, J., Chen, W.C., Pike, R., Prochazkav, Kiefer, M.C., Travis, J., Barr, P.J.: Molecular cloning and characterization of Porphyromonas gingivalis lysine specific gingipain. A new member of an emerging family of pathogenic bacterial cysteine proteinases. J Biol Chem 1997: 272; 1595-1600
100. Percival, R.S., Marsh, P.D., Devine, D.A., Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Shepherd, P., Curtis, M.A.: Effects of temperature on growth, hemagglutination and protease activity of Porphyromonas gingivalis. Infect Immun 1999: 67; 1917-21
101. Pfister, W., Sprössig, M., Wachtel, D., Mirgorod, M., Gängler, P.: Bakteriologische Untersuchungen der subgingivalen Flora bei Patienten mit marginaler Periodontitis. Zbl Bakt 1982: 252; 540-546
102. Pfister, W., Wutzler, P., Gängler, P., Lindemann, C.: Die Plaquemikroflora der gesunden Gingiva sowie bei Gingivitis und Periodontitis marginalis. Zahn- Mund- Kieferheilkunde 1987: 75; 804-808
103. Pfister, W., Eick, S., Hoffmann, Th.: Nachweis von Actinobacillus actinomycetemcomitans als Kriterium für die Progression der lokalisierten juvenilen Parodontitis. Zahnärztliche Welt 1998: 107; 8-12
104. Pike, R., McGraw W., Potempa J., Travis J.: Lysine- and arginine-specific proteinases from Porphyromonas gingivalis. Isolation, characterization and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. J Biol Chem 1994: 296; 406-11
105. Pike, R.N., Potempa, J., McGraw, W., Coetzer, T.H.T., Travis, J. Characterization of the binding activities of protease-adhesin complexes from Porphyromonas gingivalis. J Bacteriol 1996: 178; 2876-2882
106. Popadiak, K., Potempa, J., Riesbeck, K., Blom, A.M.: Biphasic effect of gingipains from Porphyromonas gingivalis on the human complement system. J Immunol 2007: 178; 7242-7250
107. Potempa, J., Pike R., Travis J.: The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of Porphyromonas gingivalis are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. Infect Immun 1995: 63; 1176-82
108. Potempa, J., Pike, R., Travis, J.: Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from Porphyromonas gingivalis (Gingipains) using peptidyl chloromethans. Biol Chem 1997: 378; 223-230
109. Potempa, J., Banbula, A., Travis, J.: Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. Periodontol 2000: 24; 153-192
110. Potemsky, C.J., Digman, S.S., Setlow, P.J.: Isolation and characterisation of Bacillus megaterium mutants containing decreased levels of spore protease. Bacteriol 1978: 135; 841-850
111. Reich, E., Hiller, K.A.: Reasons for tooth extraction in the western states of Germany. Community Dent Oral Epidemiol 1993: 21; 379-383

112. Reid, K.B.M., Porter, R.R.: The proteolytic activation system of complement. *Ann Rev Biochem* 1981: 50; 433-464
113. Reinhardt, R.A., Payne, J.B., Maze, C.A., Patil, K.D., Gallagher, S.J., Mattson, J.S.: Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal woman. *J Periodontol* 1999: 70; 823-828
114. Roberts, J.W., Roberts, C.W., Craig, N.L.: Escherichia coli recA gene product inactivates phage lambda repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978: 75; 4714
115. Ronderos, M., Jacobs, D.R., Himes, J.H., Pihlstrom, B.L.: Associations of periodontal diseases with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy. Cross-sectional evaluations of US adults from NHANES III. *J Clin Periodontol* 2000: 27; 778-786
116. Saiki, K., Konishi, K.: Identification of a Porphyromonas gingivalis novel protein Sov required for the secretion of gingipains. *Microbiol Immunol* 2007: 51; 483-491.
117. Schenkein, H.A., Fletcher, H.M., Bodnar, M., Macrina, F.L.: Increased opsonization of a prtH-defective mutant of Porphyromonas gingivalis W83 is caused by reduced degradation of complement-driven opsonins. *J Immunol* 1995: 154; 5331-7
118. Schwenzer, N.: Kieferorthopädie und Parodontologie. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart (1987)
119. Scott, C.F., Whitaker, E.J., Hammond, B.F., Colman, R.W.: Purification and characterization of a potent 70kDa thiol lysyl-proteinase (Lys-gingivain) from Porphyromonas gingivalis that cleaves kininogenes and fibrinogen. *J Biol Chem* 1993: 268; 7935-7942
120. Segal, H.L., Doyle, D.J.(eds): Protein turnover and lysosome function. London, Academic Press 1978
121. Seymor, G.F., Taylor, J.J.: Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal diseases. *Periodontology* 2004: 35; 9-13
122. Shah, H.N., Gharbia, S.E., Progulske-Fox, A., Brocklehurst, K.: Evidence for independent molecular identity and functional interaction of the haemagglutinin and cysteine proteinase (gingivain) of Porphyromonas gingivalis. *J Med Microbiol* 1992: 36; 239-44
123. Shah, H.N., Gharbia, S.E.; o'Toole, C.M.: Assessment of the relative cytotoxicity of Porphyromonas gingivalis cells, products and components on human epithelial cell lines. *J Periodonol* 1992: 63; 44-51
124. Sheets, S.M., Potempa, J., Travis, J., Casiano, C.A., Fletcher, H.M.: Gingipains from Porphyromonas gingivalis W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. *Infect Immun* 2005: 73; 1543-1552
125. Sheperd, M.G., Poulter, R.T., Sullivan, P.A.: Candida albicans: biology genetics and pathogenicity. *Annu Rev Microbiol* 1985: 39; 579-614

126. Shibata, Y., Hosogi, Y., Hayakawa, M., Hori, N., Kamada, M., Abiko, Y.: Constructions of novel human monoclonal antibodies neutralizing *Porphyromonas gingivalis* hemagglutination activity using transgenic mice expressing human Ig loci. *Vaccine* 2005; 23; 3850-3856
127. Slots, J., Zambon, J.J., Rosling, B.G., Reynolds, H.S., Christersson, L.A., Genco, R.J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity and treatment. *J Periodont Res* 1982; 17; 447-448
128. Slot, J., Greenwell, L.T., Genco, R.: Antibiotics to Prevent Complications Following Periodontal Surgery. *J Periodontol* 2004; 75; 1553-1565
129. Smalley, J.W., Birss, A.J., McKee, A.S., Marsh, P.D.: Haemin-restriction influences haemin-binding, haemagglutination and protease activity of cells and extracellular membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* W50. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 69; 63-67
130. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Goodson, J.M., Lindhe, J.: New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11; 21-32
131. Socransky, S.S., Haffajee, A.D.: Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodont Res* 1991; 26; 195-212
132. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent, R.L.Jr.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25; 134-144
133. Straube, E., Kretschmar, M., Schmidt, G., Marre, R., Kreft, B., Zingler, G.: Is *Escherichia coli* invading tubuloepithelial cells? *Zbl Bakt* 1992; 277; 193-203
134. Straube, E., Schmidt, G., Marre, R., Hacker, J.: Adhesion and internalization of *E.coli* strains expressing various pathogenicity determinants. *Zbl Bakt* 1993; 278; 218-228
135. Stroud, R.M., Krieger, M., Koeppe, R.E.II., Kossiakoff, A.A., Chambers, J.L.: Proteases and biological control. *US Cold Spring Harbor Lab* 1975; 2; 13
136. Taylor, P.W.: Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 1983; 47; 46-83
137. Teng, Y.A.: The role of acquired immunity and periodontal diseases progression. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14; 237-252
138. Tezuka, A., Hamajima, S., Hatta, H., Abiko, Y.: Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinating activity by IgY against a truncated HagA. *J Oral Sci* 2006; 48; 227-32
139. Tjäderhane, L., Hotakainen, T., Kinnunen, S., Ahonen, M., Salo, T.: The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. *Int Endod J* 2007; 40; 282-289

140. Tokuda, M., Duncan, M., Cho, M.-I., Kuramitsu, K.: Role of *Porphyromonas gingivalis* protease activity in colonization of oral surfaces. *Infect Immun* 1996: 64; 4067-4073
141. Tokuda, M., Karunakaran, T., Duncan, M., Hamada, N., Kuramitsu, H.: Role of Arg-gingipain A in virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1998: 66; 1159-1166
142. Travis J., Pike R., Imamura T., Potempa J.: *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodont Res* 1997: 32; 120-125
143. Umemoto, T., Naito, Y., Li, M., Suzuki, I., Namikawa, I.: Growth inhibition of a human oral bacterium *Porphyromonas gingivalis* by rat cysteine proteinase inhibitor cystatin S. *Lett Appl Microbiol* 1996: 23; 151-153
144. Van Dyke, T.E., Serhan, C.N.: Resolutions of inflammation: A new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 2003: 82; 82-90
145. Veith, P.D., Chen, Y.Y., Reynolds, E.C.: *Porphyromonas gingivalis* RgpA and Kgp Proteinases and adhesions are C terminally processed by the carboxypeptidase CPG70. *Infect Immun* 2004: 72; 3655-3657
146. Voellmy, R., Muratami, K., Goldberg, A.L.: Limited proteolysis in microorganisms. Washington, US Department of Health, Education and Welfare 1979: 79; 7-16
147. Walker, G.C.: Inducible DNA repair systems. *Ann Rev Biochem* 1985: 54; 425-457
148. Weinberg, A., Belton, C.M., Park, Y. and Lamont, R.J.: Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 1997: 65; 313-316
149. Williams, D.: *Pathologie der parodontalen Erkrankungen*. Carl Hanser Verlag, München (1997)
150. Wingerath, H.D., Lange, D.E.: Oral hygiene behavior of 14- and 15-year-old schoolchildren from the sociological viewpoint. *Dtsch Zahnärztl Z* 1982: 37; 565-568
151. Wingrove, J.A., DiScipio, R.G., Chen, Z., Potempa, J., Travis, J., Hugli, T.E.: Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*. *J Biol Chem* 1992: 267; 18902-18907
152. Wolf, D.H.: Control of metabolism in yeast and other lower eukaryotes through action of proteinases. *Adv Microb Physiol* 1980: 21; 267-338
153. Wolf, D.H.: Cellular control in the eukaryotic cell through action of proteinases: The yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. *Microbiol Sci* 1986: 3; 107-111

154. Wong, R.L., Gutowski, J.K., Katz, M., Goldfarb, R.H., Cohen, S.: Inductions of DNA synthesis in isolated nuclei by cytoplasmic factors: inhibition by proteinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987: 84; 241-245
155. Yamamoto, K.: Studies on periodontal pathogenic proteinases from *Porphyromonas gingivalis* and host cells. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1995: 105; 345-355
156. Zlotnik, H., Schramm, U.L., Buckley, H.R.: Purification and partial characterization of a *Nocardia brasiliensis* extracellular protease. *J Bacteriol* 1984: 157; 627-631
157. Zuxiong, C., Potempa, J., Polanowski, A., Renvert, S., Wikström, M., Travis, J.: Stimulation of proteinase and amidase activities in *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* by amino acids and dipeptides. *Infect Immun* 1991: 59; 2846-2850
158. Zuxiong, C., Potempa, J., Polanowski, A., Wikström, M., Travis, J.: Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 1992: 267; 18896-18901

Anhang

Tabelle 2

Inhibitor 1 – Einfluss auf die Adhärenz von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	702	100	789	112,4	784	111
2	741	100	766	103,4	894	120,6
3	818	100	783	95,7	633	77,4
4	750	100	632	84,3	689	91,9
5	947	100	601	63,5	678	71,6
6	841	100	609	72,4	810	96,3
7	729	100	816	111,9	419	57,5
8	514	100	678	131,9	948	184,4
9	476	100	561	117,9	535	112,4
10	391	100	520	133	481	123
11	411	100	457	111,2	555	135
12	414	100	573	138,4	606	146,4
13	479	100	528	110,2	529	110,4
14	405	100	448	110,6	489	120,7
15	367	100	462	125,9	429	116,9
16	436	100	439	100,7	501	114,9
17	1520	100	1145	75,3	846	55,6
18	1386	100	987	71,2	549	39,6
19	1360	100	852	62,6	640	47,1
Mittelwert/ STABW	720,4	100	665,6	$92,4 \pm 24$	632,4	$87,8 \pm 36,8$

Tabelle 3

Inhibitor 2 – Einfluss auf die Adhärenz von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	194	100	138	71,1	227	117
2	144	100	140	97,2	172	119,4
3	176	100	160	90,9	292	165,9
4	171	100	n.a.	n.a.	126	73,7
5	196	100	115	58,7	131	66,8
6	78	100	209	267,9	95	121,8
7	84	100	157	186,9	n.a.	n.a.
8	192	100	188	97,9	130	67,7
9	446	100	584	130,9	583	130,7
10	650	100	533	82	652	100,3
11	563	100	643	114,2	558	99,1
12	414	100	595	143,7	405	97,8
13	466	100	597	128,1	573	123
14	495	100	544	109,9	590	119,2
15	702	100	554	78,9	592	84,3
16	643	100	615	95,6	554	87,4
17	648	100	628	96,9	458	70,7
18	738	100	659	89,3	462	62,6
19	594	100	648	109,1	421	70,9
Mittelwert/ STABW	399,7	100	428,2	$107,3 \pm 48,4$	390,1	$97,6 \pm 28,3$

Tabelle 4

Inhibitor 3 – Einfluss auf die Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	419	100	632	150,8	581	138,7
2	398	100	762	191,5	857	215,3
3	437	100	595	136,2	773	176,9
4	575	100	514	89,4	845	147
5	623	100	415	66,6	468	75,1
6	465	100	434	93,3	839	180,4
7	398	100	460	115,6	538	135,2
8	335	100	528	157,6	505	150,7
9	917	100	836	91,2	684	74,6
10	853	100	896	105	689	80,8
11	925	100	644	69,6	770	83,2
12	903	100	793	87,8	539	59,7
13	760	100	666	87,6	545	71,7
14	904	100	695	76,9	836	92,5
15	762	100	674	88,5	899	118
16	821	100	869	105,8	869	105,8
17	798	100	812	101,8	1080	135,3
18	822	100	682	83	853	104,1
19	703	100	700	99,6	513	73
20	720	100	740	102,8	746	103,6
21	808	100	598	74	747	92,5
22	865	100	769	88,9	688	79,5
23	775	100	687	88,6	553	71,4
24	643	100	590	91,8	586	91,1
25	659	100	568	86,2	594	90,1
26	726	100	692	95,3	693	95,5
27	460	100	844	183,5	760	165,2
Mittelwert/ STABW	684,2	100	670,2	$98 \pm 32,3$	705,6	$103,1 \pm 40,3$

Tabelle 5

Inhibitor 6 – Einfluss auf die Adhärenz von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	2	100	2	100	5	250
2	5	100	2	40	6	120
3	10	100	2	20	5	50
4	295	100	381	129,2	424	143,7
5	339	100	327	96,5	410	120,9
6	305	100	397	130,2	510	167,2
7	407	100	416	102,2	509	125,1
8	460	100	393	85,4	471	102,4
9	270	100	305	113	448	165,9
10	365	100	365	100	492	134,8
11	376	100	363	96,5	479	127,4
12	1020	100	940	92,2	869	85,2
13	903	100	934	103,4	1050	116,7
14	866	100	1060	122,4	920	106,2
15	1220	100	1040	85,2	1060	86,9
16	1200	100	1080	90	946	78,8
17	1180	100	930	78,8	934	79,2
18	1550	100	954	61,5	877	56,6
19	912	100	1030	112,9	1020	111,8
20	538	100	531	98,7	438	81,4
21	547	100	516	94,3	436	79,7
Mittelwert/ STABW	608,1	100	569,9	$93,7 \pm 26,6$	586,1	$96,4 \pm 44,5$

Tabelle 6Inhibitor 7 – Einfluss auf die Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	511	100	394	77,1	524	102,5
2	323	100	370	114,6	371	114,9
3	429	100	671	156,4	356	83
4	572	100	484	84,6	305	53,3
5	514	100	441	85,8	275	53,5
6	539	100	514	95,4	370	68,6
7	608	100	614	101	332	54,6
8	602	100	489	81,2	370	61,5
9	271	100	211	77,8	218	80,4
10	219	100	154	70,3	107	48,9
11	218	100	189	86,7	133	61
12	191	100	139	72,8	107	56
13	162	100	237	146,3	99	61,1
14	167	100	201	120,4	158	94,6
15	512	100	191	37,3	166	32,4
16	196	100	226	115,3	170	86,7
17	468	100	416	88,8	326	69,7
18	478	100	428	89,5	345	72,2
Mittelwert/ STABW	387,8	100	353,8	$91,2 \pm 28,1$	262,9	$67,8 \pm 20,7$

Tabelle 7Inhibitor 9 – Einfluss auf die Adhärenz von *Porphyromonas gingivalis* an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	226	100	233	103,1	167	73,9
2	237	100	196	82,7	147	62
3	251	100	222	88,4	186	74,1
4	398	100	258	64,8	175	44
5	238	100	236	99	119	50
6	330	100	183	55,5	156	47,3
7	279	100	258	92,5	185	66,3
8	249	100	279	112	188	75,5
9	491	100	385	78,4	506	103,1
10	538	100	433	80,5	407	75,7
11	439	100	423	96,4	346	78,9
12	561	100	479	85,4	481	85,7
13	28	100	n.a.	n.a.	34	121,4
14	90	100	31	34,4	14	15,6
Mittelwert/ STABW	311,7	100	278,2	$89,3 \pm 21$	222,2	$71,3 \pm 26$

Tabelle 8

Inhibitor 1 – Einfluss auf die Internalisierung von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	1680	100	1690	100,6	1550	92,2
2	1530	100	1840	120,3	2400	156,9
3	1970	100	1810	91,9	2180	110,7
4	1600	100	2130	133,1	2760	172,5
5	1660	100	1910	115,1	2060	124,1
6	1970	100	2000	101,5	1930	98
7	1920	100	n.a.	n.a.	2110	109,9
8	1320	100	1240	93,9	1320	100
9	1430	100	1370	95,8	1130	79
10	1150	100	1710	148,7	735	63,9
11	1260	100	1330	105,6	1020	80,9
12	1120	100	1520	135,7	1170	104,5
13	1210	100	1080	89,3	1140	94,2
14	1220	100	1070	87,7	1260	103,3
15	1590	100	1050	66	876	55,1
16	688	100	618	89,8	978	142,2
17	678	100	509	75,1	714	105,3
18	736	100	589	80	747	101,5
19	809	100	502	62,1	779	96,3
20	894	100	512	57,3	738	82,6
21	732	100	761	104	822	112,3
22	692	100	625	90,3	741	107,1
23	699	100	n.a.	n.a.	663	94,8
24	846	100	682	80,6	562	66,4
25	924	100	696	75,3	588	63,6
26	882	100	742	84,1	642	72,8
Mittelwert/ STABW	1200,4	100	1166,1	$97,1 \pm 23$	1216	$101,3 \pm 27,6$

Tabelle 9

Inhibitor 2 – Einfluss auf die Internalisierung von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	436	100	384	88,1	426	97,7
2	331	100	316	95,5	256	77,3
3	353	100	305	86,4	304	86,1
4	301	100	340	113	364	120,9
5	346	100	216	62,4	391	113
6	203	100	445	219,2	294	144,8
7	272	100	375	137,9	359	132
8	312	100	310	99,4	328	105,1
9	1300	100	1360	104,6	n.a.	n.a.
10	1310	100	1300	99,2	1080	82,4
11	1350	100	1370	101,5	1030	76,3
12	1120	100	1100	98,2	1050	93,8
13	1160	100	1260	108,6	1090	94
14	1160	100	1150	99,1	1040	89,7
15	984	100	1170	118,9	1120	113,8
16	1270	100	1420	111,8	1070	84,3
17	528	100	464	87,9	386	73,1
18	484	100	459	94,8	462	95,5
19	546	100	475	87	395	72,3
Mittelwert/ STABW	724,5	100	748,4	$103,3 \pm 31,5$	635,8	$87,8 \pm 20,6$

Tabelle 10

Inhibitor 3 – Einfluss auf die Internalisierung von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	847	100	827	97,6	966	114
2	580	100	762	131,4	979	168,8
3	856	100	949	110,9	779	91
4	639	100	766	119,9	888	139
5	593	100	719	121,2	722	121,8
6	702	100	720	102,6	1240	176,6
7	801	100	849	106	888	110,9
8	686	100	982	143,1	969	141,3
9	1120	100	1060	94,6	1090	97,3
10	677	100	1060	156,6	852	125,8
11	901	100	879	97,6	1020	113,2
12	1110	100	1220	109,9	1030	92,8
13	761	100	1040	136,7	790	103,8
14	791	100	971	122,8	1240	156,8
15	712	100	1170	164,3	1360	191
16	896	100	1160	129,5	1050	117,2
17	1790	100	1480	82,7	1780	99,4
18	1460	100	1270	87	1600	109,6
19	1260	100	1480	117,5	1620	128,6
20	1480	100	1380	93,2	1370	92,6
21	1750	100	1850	105,7	1680	96
22	1700	100	1110	65,3	1320	77,6
23	1740	100	1290	74,1	1700	97,7
24	1340	100	1430	106,7	1630	121,6
25	814	100	857	105,3	938	115,2
26	835	100	828	99,2	954	114,3
27	824	100	846	102,7	756	91,7
Mittelwert/ STABW	1024,6	100	1072,4	104,7± 23,1	1156	112,8± 28

Tabelle 11

Inhibitor 6 – Einfluss auf die Internalisierung von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	9	100	1	11,1	5	55,6
2	4	100	n.a.	n.a.	9	225
3	14	100	2	14,3	6	42,9
4	504	100	572	113,5	992	196,9
5	678	100	566	83,5	1160	171,1
6	528	100	581	110	730	138,3
7	614	100	521	84,9	859	139,9
8	625	100	429	68,6	493	78,9
9	521	100	750	144	1190	228,4
10	496	100	618	124,6	814	164,1
11	496	100	755	152,2	699	140,9
12	1830	100	1670	91,3	1670	91,3
13	1720	100	1510	87,8	2010	116,9
14	1990	100	1800	90,5	1920	96,5
15	1700	100	2000	117,6	2040	120
16	1870	100	2260	120,9	1870	100
17	2070	100	1670	80,7	1850	92,5
18	2060	100	1880	91,3	1980	96,1
19	1890	100	1510	79,9	1850	97,9
20	645	100	645	100	524	81,2
21	638	100	649	101,7	539	84,5
Mittelwert/ STABW	995,3	100	1019,5	$102,4 \pm 35$	1105,2	$111 \pm 51,3$

Tabelle 12

Inhibitor 7– Einfluss auf die Internalisierung von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	1590	100	979	61,6	1360	85,5
2	1220	100	1200	98,4	1540	126,2
3	1200	100	1160	96,7	952	79,3
4	1100	100	1120	101,8	1220	110,9
5	1670	100	1200	71,9	1190	71,3
6	1410	100	1020	72,3	1200	85,1
7	1310	100	1090	83,2	988	75,4
8	883	100	1360	154	856	96,9
9	237	100	200	84,4	553	233,3
10	132	100	285	215,9	337	255,3
11	296	100	339	114,5	314	106,1
12	359	100	541	150,7	307	85,5
13	448	100	296	66,1	272	60,7
14	404	100	405	100,2	362	89,6
15	465	100	333	71,6	337	72,5
16	288	100	326	113,2	271	94,1
17	648	100	573	88,4	549	84,7
18	672	100	592	88,1	573	85,3
Mittelwert/ STABW	796,2	100	723,3	90,8 \pm 38,4	732,3	92 \pm 53

Tabelle 13

Inhibitor 9 – Einfluss auf die Internalisierung von Porphyromonas gingivalis an KB-Zellen

Versuch-Nr.	Kontrolle		Konzentration 2×10^{-6}		Konzentration 2×10^{-5}	
	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%	Koloniezahl	%
1	281	100	245	87,2	342	121,7
2	423	100	354	83,7	366	86,5
3	476	100	341	71,6	323	67,9
4	449	100	350	78	295	65,7
5	524	100	349	66,6	n.a.	n.a.
6	518	100	376	72,6	348	67,2
7	336	100	478	142,3	354	105,4
8	437	100	459	105	349	79,9
9	170	100	n.a.	n.a.	337	198,2
10	442	100	587	132,8	547	123,8
11	520	100	340	65,4	789	151,7
12	398	100	613	154	n.a.	n.a.
13	637	100	468	73,5	80	12,6
14	786	100	415	52,8	97	12,3
15	821	100	37	4,5	105	12,8
16	673	100	10	1,5	102	15,2
17	387	100	345	89,1	317	81,9
Mittelwert/ STABW	477,9	100	360,4	$75,4 \pm 41,7$	316,7	$66,3 \pm 54,6$

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube

danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten.

Besonders herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister

für die Überlassung des Themas und die freundliche und umfassende Betreuung,

Frau PD Dr. med. habil. S. Eick und

Herrn Prof. Dr. J. Stürzebecher

für die fachliche Hilfestellung bei der Durchführung der mikrobiologischen Versuche und deren Auswertung.

Weiterhin danke ich auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, die mich unterstützten.

Meinen Eltern und Rolf möchte ich ganz lieb danken.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Prof. Dr. med. habil. W. Pfister,
Frau PD Dr. med. habil. S. Eick und
Herr Prof. Dr. J. Stürzebecher

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt,